

## **WO9951743**

### **Translation from Japanese of the Field of the Invention**

**Date of publication: 14.10 1999**

**Translated by NBT**

The present invention relates to a human/mouse chimera antibody comprising a variable region (V region) of a mouse monoclonal antibody against human tissue factor (TF) and a constant region (C region) of a human antibody, a humanized antibody wherein a complementarity-determining region (CDR) of a light chain (L chain) V region and a heavy chain (H chain) V region of a mouse monoclonal antibody against human TF is grafted into a human antibody, an L chain and an H chain of the antibody, and a fragment of a V region which constitutes an L chain or an H chain of the antibody. The invention also relates to a process for constructing a humanized antibody against human TF.

The invention further relates to a DNA encoding the above-mentioned antibody, particularly a fragment of its V region, and a DNA encoding an L chain or H chain containing the V region. The invention also relates to a recombinant vector containing the DNA and a host transformed with the vector.

The invention further relates to a process for producing a chimera antibody against human TF and a humanized antibody. The invention also relates to a pharmaceutical composition containing a humanized antibody against human TF as an effective ingredient and a medicament for treating disseminated intravascular coagulation (DIC).

#### **Translation of Claims**

1. A chimera H chain comprising a heavy (H) chain variable (V) region of a mouse monoclonal antibody against human tissue factor (TF) and an H chain constant (C) region of a human antibody, wherein said H chain V region has any amino acid sequence of

- (1) an amino acid sequence of SEQ ID NO:139 (ATR-2),
  - (2) an amino acid sequence of SEQ ID NO:140 (ATR-3),
  - (3) an amino acid sequence of SEQ ID NO:141 (ATR-4),
  - (4) an amino acid sequence of SEQ ID NO:142 (ATR-5),
  - (5) an amino acid sequence of SEQ ID NO:143 (ATR-7), and
  - (6) an amino acid sequence of SEQ ID NO:144 (ATR-8).
2. The chimera H chain according to claim 1, wherein said H chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:142.
3. The chimera H chain according to claim 1 or 2, wherein said H chain C region is a C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 or C $\gamma$ 4 region.
4. The chimera H chain according to any one of claims 1 to 3, wherein said H chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:142, and said H chain C region is C $\gamma$ 4.
5. A chimera L chain comprising a light (L) chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and an L chain C region of a human antibody, wherein said L chain V region has any amino acid sequence of:
- (1) an amino acid sequence of SEQ ID NO:145 (ATR-2),
  - (2) an amino acid sequence of SEQ ID NO:146 (ATR-3),
  - (3) an amino acid sequence of SEQ ID NO:147 (ATR-4),
  - (4) an amino acid sequence of SEQ ID NO:148 (ATR-5),
  - (5) an amino acid sequence of SEQ ID NO:149 (ATR-7), and
  - (6) an amino acid sequence of SEQ ID NO:150 (ATR-8).
6. The chimera L chain according to claim 5, wherein said L chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:148.
7. The chimera L chain according to claim 5 or 6, wherein said L chain C region is a C $\lambda$  or C $\kappa$  region.

8. The chimera L chain according to any one of claims 5 to 7, wherein said L chain V region has the amino acid sequence of SEQ ID NO:148, and said L chain C region is Cx.

9. A chimera antibody against human TF comprising the chimera H chain according to any one of claims 1 to 4 and the chimera L chain according to any one of claims 5 to 8.

10. A chimera antibody against human TF comprising the chimera H chain according to claim 4 and the chimera L chain according to claim 8.

11. A humanized H chain V region comprising a complementarity-determining region (CDR) of an H chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and a framework region (FR) of an H chain V region of a human antibody, wherein said CDR has the following amino acid sequences:

H-CDR1: Asp Tyr Tyr Met His (SEQ ID NO:133)

H-CDR2: Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly (SEQ ID NO:134)

H-CDR3: Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:135).

12. A humanized H chain V region, wherein said FR has the following amino acid sequences:

H-FR1: Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser  
Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (SEQ ID NO:110)

H-FR2: any of the following sequences (1) to (3):

(1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (SEQ ID NO:111)

(2) Try Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly (SEQ ID NO:112)

(3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly (SEQ ID NO:113)

H-FR3: any of the following sequences (1) to (10):

(1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn  
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:114)

(2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:115)

(3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:116)

(4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:117)

(5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:118)

(6) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:119)

(7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg (SEQ ID NO:120)

(8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala

Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg (SEQ ID NO:121)

(9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:122)

(10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (SEQ ID NO:123)

FR4: Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser (SEQ ID NO:124).

13. The humanized H chain V region according to claim 11 or 12, which has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:30 (version a), SEQ ID NO:40 (version b), SEQ ID NO:42 (version c), SEQ ID NO:50 (version d), SEQ ID NO:52 (version e), SEQ ID NO:58 (version f), SEQ ID NO:60 (version g), SEQ ID NO:64 (version h), SEQ ID NO:70 (version i), SEQ ID NO:72 (version j), SEQ ID NO:76 (version b1), SEQ ID NO:78 (version d1), SEQ ID NO:82 (version b3) or SEQ ID NO:84 (version d3).

14. The humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 13, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:40 (version b).

15. The humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 13, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:70 (version i).

16. A humanized L chain V region comprising a CDR of an L chain V region of a mouse monoclonal antibody against human TF and an FR of a human L chain V region, wherein said CDR has the following amino acid sequences:

L-CDR1: Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser (SEQ ID NO:136)

L-CDR2: Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (SEQ ID NO:137)

L-CDR3: Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (SEQ ID NO:138).

17. The humanized L chain V region according to claim 16, wherein said FR has the following amino acid sequences:

L-FR1: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
Cys (SEQ ID NO:125)

L-FR2: any of the following sequences (1) to (3):

(1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (SEQ ID NO:126)

(2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr (SEQ ID NO:127)

(3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr (SEQ ID NO:128)

L-FR3: any of the following sequences (1) to (3):

(1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:129)

(2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:130)

(3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO:131)

L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO:132).

18. The humanized L chain V region according to claim 16 or 17, which has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:93 (version a), SEQ ID NO:99 (version b), SEQ ID NO:101 (version c), SEQ ID NO:107 (version b1) or SEQ ID NO:109 (version b2).

19. The humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 18, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:99 (version b).

20. The humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 18, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:109 (version b2).

21. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 15 and an H chain C region of a human antibody.

22. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region (version b) according to claim 14 and an H chain C region of a human antibody.

23. A humanized H chain of an antibody against human TF, comprising the humanized H chain V region (version i) according to claim 15 and an H chain C region of a human antibody.

24. The humanized H chain according to any one of claims 21 to 23, wherein said H chain C region of a human antibody is C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 or C $\gamma$ 4.

25. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 20 and an L chain C region of a human antibody.

26. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region (version b) according to claim 19 and an L chain C region of a human antibody.

27. A humanized L chain of an antibody against human TF, comprising the humanized L chain V region (version b2) according to claim 20 and an L chain C region of a human antibody.

28. The humanized L chain according to any one of claims 25 to 27, wherein said L chain C region of a human antibody is C $\lambda$  or C $\kappa$ .

29. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain according to any one of claims 21 to 24 and the humanized L chain according to any one of claims 25 to 28.

30. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain (version b) according to claim 22 and the humanized L chain (version b) according to claim 26.
31. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain (version i) according to claim 23 and the humanized L chain (version b) according to claim 26.
32. A humanized antibody against human TF, comprising the humanized H chain (version i) according to claim 23 and the humanized L chain (version b2) according to claim 27.
33. A DNA encoding the chimera H chain according to any one of claims 1 to 4.
34. A DNA encoding the chimera H chain according to any one of claims 2 to 4.
35. A DNA encoding the chimera L chain according to any one of claims 5 to 8.
36. A DNA encoding the chimera L chain according to any one of claims 6 to 8.
37. A DNA encoding the humanized H chain V region according to any one of claims 11 to 15.
38. A DNA encoding the humanized H chain V region (version b) according to claim 14.
39. A DNA encoding the humanized H chain V region (version i) according to claim 15.
40. A DNA encoding the humanized L chain V region according to any one of claims 16 to 20.
41. A DNA encoding the humanized L chain V region (version b) according to claim 19.
42. A DNA encoding the humanized L chain V region (version b2) according to claim 20.
43. A DNA encoding the humanized H chain according to any one of claims 21 to 24.
44. A DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 22 or 24.
45. A DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 23 or 24.
46. A DNA encoding the humanized L chain according to any one of claims 25 to 28.
47. A DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 26 or 28.
48. A DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 27 or 28.
49. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 33.

50. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 34.
51. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 35.
52. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 36.
53. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 33 and the DNA encoding the chimera L chain according to claim 35.
54. An expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 34 and the DNA encoding the chimera L chain according to claim 36.
55. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 43.
56. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 44.
57. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45.
58. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain according to claim 46.
59. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 47.
60. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 48.
61. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 43 and the DNA encoding the humanized L chain according to claim 46.



62. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 44 and the DNA encoding the humanized L chain (version h) according to claim 47.

63. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45 and the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 47.

64. An expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 45 and the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 48.

65. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 49 and the expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 51.

66. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the chimera H chain according to claim 50 and the expression vector comprising the DNA encoding the chimera L chain according to claim 52.

67. A host transformed with the expression vector according to claim 53.

68. A host transformed with the expression vector according to claim 54.

69. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain according to claim 55 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain according to claim 58.

70. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version b) according to claim 56 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 59.

71. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 57 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b) according to claim 59.

72. A host transformed with the expression vector comprising the DNA encoding the humanized H chain (version i) according to claim 57 and the expression vector comprising the DNA encoding the humanized L chain (version b2) according to claim 6.

73. A host transformed with the expression vector according to claim 61.

74. A host transformed with the expression vector according to claim 62.

75. A host transformed with the expression vector according to claim 63.

76. A host transformed with the expression vector according to claim 64.

77. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 65 and collecting a chimera antibody from said culture product.

78. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 66 and collecting a chimera antibody from said culture product.

79. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 67 and collecting a chimera antibody from said culture product.

80. A process for producing a chimera antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 68 and collecting a chimera antibody from said culture product.

81. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 69 and collecting a humanized antibody from said culture product.

82. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 70 and collecting a humanized antibody from said culture product.

83. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 71 and collecting a humanized antibody from said culture product.

84. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 72 and collecting a humanized antibody from said culture product.

85. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 73 and collecting a humanized antibody from said culture product.

86. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 74 and collecting a humanized antibody from said culture product.

87. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 75 and collecting a humanized antibody from said culture product.

88. A process for producing a humanized antibody against human TF, which comprises culturing the host according to claim 76 and collecting a humanized antibody from said culture product.

89. A process for producing a natural humanized antibody having a complementarity-determining region (CDR) derived from a non-human origin and a framework region (FR) derived from a natural human antibody and possessing reduced immunogenicity, which comprises:

(1) preparing a non-human monoclonal antibody reactive to an aimed antigen,

(2) preparing plural human antibodies having a high homology to the amino acid sequence of FR in the monoclonal antibody of said (1),

(3) constructing a first humanized antibody by substituting four FRs of one kind of the human antibody in said (2) with corresponding FRs of the non-human monoclonal antibody said (1),

(4) measuring a binding capacity of the humanized antibody constructed in said (3) toward the antigen or an ability of the antibody to neutralize the biological activity of the antigen,

(5) constructing a second humanized antibody by substituting one to three FRs of the humanized antibody constructed in said (3) with corresponding FRs of the human antibody different from that used in (3) among the human antibodies prepared in (2),

(6) comparing the second humanized antibody constructed in said (5) and the first humanized antibody obtained in said (3) in view of the binding capacity toward the antigen or the ability to neutralize the biological activity of the antigen, and selecting a humanized antibody exhibiting a preferable activity,

(7) carrying out the steps of said (3) to (6) upon the humanized antibody selected in said (6),

and

(8) repeating the steps of said (3) to (6) until a humanized antibody having an activity equal to that of the non-human monoclonal antibody in said (1).

90. The process according to claim 89, wherein said aimed antigen is a human tissue factor (TF).

91. A humanized antibody obtainable through the process of claim 89.

92. A humanized antibody obtainable through the process of claim 90.

93. A medicament for treating disseminated intravascular coagulation (DIC) comprising the humanized antigen according to any one of claims 29 to 32 and 92.



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/13, C12P 21/08, C12N 5/10</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/51743</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年10月14日(14.10.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/01768  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月2日(02.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/91850                      1998年4月3日(03.04.98)                      JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人</b> (米国についてののみ) 佐藤 功(SATO, Koh)[JP/JP] 安達秀樹(ADACHI, Hideki)[JP/JP] 薮田尚弘(YABUTA, Naohiro)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Sizuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: HUMANIZED ANTIBODY AGAINST HUMAN TISSUE FACTOR (TF) AND PROCESS FOR CONSTRUCTING HUMANIZED ANTIBODY</b>  <b>(54) 発明の名称</b> ヒト組織因子 (TF) に対するヒト型化抗体およびヒト型化抗体の作製方法  <b>(57) Abstract</b> A humanized antibody against tissue factor (TF) which comprises: A. a humanized H chain containing (1) an H chain V region containing the H chain CDR of a mouse monoclonal antibody against TF and the H chain FR of a human antibody, and (2) the H chain C region of a human antibody; and B. a humanized L chain containing (1) an L chain V region containing the L chain CDR of a mouse monoclonal antibody against TF and the L chain FR of a human antibody, and (2) the L chain C region of a human antibody. The mouse monoclonal antibody CDR is grafted into the human antibody to construct the humanized V region. Next, the FR thereof is replaced by the corresponding FR of another human antibody with a high homology, thus detecting a highly active humanized antibody.		

(57)要約

A. (1) 組織因子 (TF) に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRとヒト抗体のH鎖FRとを含んで成るH鎖V領域、及び(2) ヒト抗体H鎖C領域、を含んで成るヒト型化H鎖；並びに  
B. (1) TFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRとヒト抗体のL鎖FRとを含んで成るL鎖V領域、及び(2) ヒト抗体L鎖C領域、を含んで成るヒト型化L鎖；を含んで成る、TFに対するヒト型化抗体。

ヒト抗体にマウスモノクローナル抗体のCDRをグラフトすることによりヒト型化V領域を作製した後、そのFRを相同性の高い他のヒト抗体の対応するFRで置換することにより活性の高いヒト型化抗体を探索する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

ヒト組織因子（TF）に対するヒト型化抗体およびヒト型化抗体の  
作製方法

## 発明の分野

本発明は、ヒト組織因子（TF）に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の定常領域（C領域）とからなるヒト／マウスキメラ抗体、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖（L鎖）V領域及び重鎖（H鎖）V領域の相捕性決定領域（CDR）がヒト抗体に移植されているヒト型化（humanized）抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法に関する。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAに関する。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。

本発明はさらに、ヒトTFに対するキメラ抗体及びヒト型化抗体の製造方法に関する。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群（DIC）治療薬に関する。

## 背景技術

組織因子（TF）は、細胞表面に発現される凝固第VII因子受容体であり、凝固第VII因子との複合体形成を通じて、凝固第IX因子およびX因子の活性化に不可欠な役割を担っており、血液凝

固反応の実質的な開始因子と位置づけられている。

T F は血管を構成する線維芽細胞や平滑筋細胞などに発現されており、血管損傷の際に凝固系を活性化して止血機能を果たすことが知られている。

D I C は、血管内での凝固系の活性化によって全身の主として細小血管内に血栓が多発する疾患である。血小板や凝固因子が消費されて低下することにより、血栓とは逆の現象である出血を生じることも少なくない。また多発した微小血栓により重要臓器の微小循環不全をきたし、一旦発症すると不可逆的な機能障害を残すことも多く、D I C の予後が不良となるため、重要な疾患と認識されている。

厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班平成2年度および4年度の研究報告書から推定される基礎疾患の割合は、造血器悪性腫瘍が約30%、固形癌約20%、感染症約15%、産科的疾患約10%、肝疾患6%、ショック5%、心血管系疾患3%である。またD I C の発症頻度は白血病が約15%、悪性リンパ種が6～7%と高く、固形癌では3%程度である。

これら種々の疾患に合併してD I C は発症するが、その原因物質は共通であり、それがT F である。すなわち、急性白血病や悪性リンパ腫、固形癌においては腫瘍細胞のT F の生成・発現の異常亢進、感染症（特にグラム陰性菌性敗血症）においては単球・血管内皮細胞におけるT F 産生・発現の亢進、劇症肝炎では壊死した肝組織からのT F の血中への流入、大動脈瘤・心臓瘤・巨大血管腫では血管内面でのT F 形成、また産科的疾患（羊水栓塞・常位胎盤早期剝離）や手術・外傷・火傷においてもT F の血中への流入がD I C の発症機序と考えられている。

原疾患（基礎疾患）の治療が第一であるが、実際にはこれが容易



ではない。

現状のDIC治療法としては、抗凝固療法と補充療法が行われている。抗凝固療法の中心となっているのはヘパリン製剤（未分画ヘパリン、低分子ヘパリン）であり、合成蛋白分解酵素阻害剤（メシル酸ガベキサート、メシル酸ナファモスタット）や濃縮血漿製剤（アンチトロンビンIII、活性化プロテインC製剤）も用いられている。補充療法としては濃縮血小板血漿や新鮮凍結血漿（フィブリンの補給）、洗浄赤血球等がある。

しかし現状の治療薬では、有効性や副作用の面で十分に満足できるものはなく、DICからの完全離脱が出来ない場合がほとんどであることより、治療効果が高く副作用の少ない薬剤の使用が期待されている。

一方、新しいDIC治療の試みとしては、トロンボモジュリン製剤やヒルジン、抗PAF剤がある。TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)や、FXa選択的阻害剤が経口投与可能な抗凝固・抗血栓剤として注目を集めている。また、TFの活性を中和するものとして、WO 88 / 0 7 5 4 3 には、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体が、WO 96 / 4 0 9 2 1 には、ヒト型化抗ヒトTF抗体として開示されている。

マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体は、DICに於いて主薬効に伴う出血傾向などを示さない安全で有効な治療薬となることが期待できる。しかしながら、マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性（「抗原性」という場合もある）を有し、このため、ヒトにおけるマウスモノクローナル抗体の医学療法的価値は制限されている。例えば、マウス抗体をヒトに投与すると異物として代謝されうるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウ

ス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体（HAMA）は、血清病又は他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起する。したがって、マウスモノクローナル抗体をヒトに頻回投与することはできない。

これらの問題を解決するため、非ヒト由来の抗体、例えばマウス由来のモノクローナル抗体の免疫原性を低減させる方法が開発された。その一つが、抗体の可変領域（V領域）はもとのマウスモノクローナル抗体に由来し、定常領域（C領域）は適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。

得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の可変領域を完全な形で含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来するアミノ酸配列の比率が実質的に減少しており、それ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想されるが、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある（LoBuglio, A., F.らProc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989）。

マウス抗体の免疫原性を低減させるための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させることが期待される。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）のみをヒト可変領域に移植して「再構成」（reshaped）ヒト可変領域を作製する。ただし、必要によっては、再構成ヒト可変領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているフレームワーク領域（FR）の一部のアミノ酸配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒ

ト以外のアミノ酸配列に由来する部分は、C D R及び極く一部のF Rのみである。C D Rは超可変アミノ酸配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。

ヒト型化抗体については、さらに、Riechmann, L.らNature, 332, 323-327, 1988; Verhoeye, M.らScience, 239, 1534-1536, 1998; Kettleborough, C.A.らProtein Engng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H., Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S.D.らProc.Natl.Acad.Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P.R., Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M.S.らProc.Natl.Acad.Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Cater, P.らProc.Natl.Acad.Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M.S.らJ.Immunol., 148, 1149-1154, 1992; 及びSato, K., らCancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと。

従来のヒト型化技術では、フレームワーク領域(F R)の一部にマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植されたアミノ酸配列を含む。そのため、ヒトにおいて治療薬として投与した場合に、可変領域の一ないし数アミノ酸ではあるが、ヒトに存在しないアミノ酸配列を有する部位に対する抗体ができる危険性が存在する。この危険性を回避するために、第三のヒト型化技術を考案した。すなわち、三個のC D Rの立体構造を保持するために必要な四個のF R (F R 1 ~ 4) について、一つのF Rを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のF Rと相同性の高いヒト抗体のF Rを置換する方法である。この際、データベース上に存在するヒト抗体から数種類のF Rを選択し、順次置換(shuffle)することにより活性の高いヒト型化抗体の作製を行う。

こうすることにより、可変領域の中でC D Rを除くF Rは、全てヒト抗体由来のアミノ酸配列を有するヒト型化抗体を作製すること

が出来る。このため、マウスCDRを担持するヒト型化抗体は、もはやヒトCDRを含有するヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

前記のごとく、ヒト型化抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒト型化抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、中和活性を示すヒト型化抗体を作製するためには種々の工夫が必要である（例えば、Sato, K.ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと）。

#### 発明の開示

本発明は、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の定常領域（C領域）とからなるヒト／マウスキメラ抗体、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖（L鎖）V領域及び重鎖（H鎖）V領域の相捕性決定領域がヒト抗体に移植されているヒト型化(humanized)抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域の断片を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体の作製方法を提供することを目的とする。

本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域の断片をコードするDNA、及びV領域の断片を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAを提供することを目的とする。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主を提供することを目的とする。本発明はさらに、ヒトTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び播種性血管内凝固症候群(DIC)治療薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒト

T F に対するマウスモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性が低減されている抗体を得ることに成功し、また、新しいヒト型化抗体の作製方法を開発し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ヒト抗体のH鎖C領域、及びヒトT F に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片を含むキメラH鎖に関する。H鎖V領域としては、配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、C領域としてはC $\gamma$ 4領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト抗体のL鎖C領域、及びヒトT F に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の断片を含むキメラL鎖に関する。L鎖V領域としては、配列番号15で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、L鎖C領域としてはC $\kappa$ 領域のものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖及びキメラL鎖を含む、ヒトT F に対するヒトマウスキメラモノクローナル抗体に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域(FR)1~4、及びヒトT F に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の相補性決定領域(CDR)1~3を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片に関する。CDR1~3としては、それぞれ配列番号133~135で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のH鎖V領域FR1との相同性が40%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のH鎖V領域FR2との相同性が40%以上のヒト抗体FR2が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のH鎖V領域FR3との相同性が40%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR4としては、マウス抗体のH鎖V領域FR4との相同性が40%以上のヒト抗体FR4が挙げられる。

好ましくは、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、マウス抗体のH鎖V領域FR1との相同性が50%以上のヒト抗体FR1が挙げられ、FR2としては、マウス抗体のH鎖V領域FR2との相同性が70%以上のヒト抗体FR2が挙げられ、FR3としては、マウス抗体のH鎖V領域FR3との相同性が65%以上のヒト抗体FR3が挙げられ、FR4としては、マウス抗体のH鎖V領域FR4との相同性が80%以上のヒト抗体FR4が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR2としては、ヒト抗体L39130、ヒト抗体P01742およびヒト抗体のZ80844が挙げられ、FR3としては、ヒト抗体L39130、ヒト抗体Z34963、ヒト抗体P01825、ヒト抗体M62723、ヒト抗体Z80844、ヒト抗体L04345、ヒト抗体S78322、ヒト抗体Z26827、ヒト抗体U95239およびヒト抗体L03147が挙げられ、FR4としては、ヒト抗体L39130が挙げられる。

好ましい例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR2としては、ヒト抗体L39130、およびヒト抗体のZ80844が挙げられ、FR3としては、ヒト抗体Z34963、ヒト抗体M62723およびヒト抗体U95239が挙げられ、FR4としてヒト抗体L39130が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体のH鎖V領域のFR1としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR2としては、ヒト抗体L39130が挙げられ、FR3としては、ヒト抗体Z34963およびヒト抗体U95239が挙げられ、FR4としてヒト抗体L39130が挙げられる。

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号としてK a b a

t の規定 (Kabat, E. A. ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。

さらに、本発明は、配列番号 30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82、84 で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域の断片に関する。

さらに、本発明は、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の FR 1～4、及びヒト TF に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の CDR 1～3 を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域の断片に関する。CDR 1～3 としては、それぞれ配列番号 136～138 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。ヒト抗体の L 鎖 V 領域の FR 1 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 1 との相同性が 40% 以上のヒト抗体 FR 1 が挙げられ、FR 2 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 2 との相同性が 40% 以上のヒト抗体 FR 2 が挙げられ、FR 3 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 3 との相同性が 40% 以上のヒト抗体 FR 3 が挙げられ、FR 4 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 4 との相同性が 40% 以上のヒト抗体 FR 4 が挙げられる。

好ましくは、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の FR 1 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 1 との相同性が 75% 以上のヒト抗体 FR 1 が挙げられ、FR 2 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 2 との相同性が 80% 以上のヒト抗体 FR 2 が挙げられ、FR 3 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 3 との相同性が 70% 以上のヒト抗体 FR 3 が挙げられ、FR 4 としては、マウス抗体の L 鎖 V 領域 FR 4 との相同性が 80% 以上のヒト抗体 FR 4 が挙げられる。具体的な例としては、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の FR 1 としては、ヒト抗体 Z37332 が挙げられ、FR 2 としては、ヒト抗体 Z37332

およびヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 および P 0 1 6 0 7 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。さらに好ましい例としては、ヒト抗体の L 鎖 V 領域の F R 1 としては、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられ、F R 2 としては、ヒト抗体 X 9 3 6 2 5 が挙げられ、F R 3 としては、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 が挙げられ、F R 4 としてヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 が挙げられる。

さらに、本発明は、フレームワーク領域中の番号として K a b a t の規定 (Kabat, E. A. ら、US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) による。

さらに、本発明は、配列番号 9 3、9 9、1 0 1、1 0 7 又は 1 0 9 で表されるアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域の断片に関する。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域の断片及びヒト抗体の H 鎖 C 領域の断片を含む、ヒト T F に対するヒト型化抗体の H 鎖に関する。ここで、C 領域としては C  $\gamma$  4 領域、ヒト抗体由来の F R 1 ~ 4 としては、それぞれヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 1)、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 2)、ヒト抗体 Z 3 4 9 6 3 (F R 3) またはヒト抗体 U 9 5 2 3 9 (F R 3)、ヒト抗体 L 3 9 1 3 0 (F R 4) 由来のもの、そして C D R 1 ~ 3 としてはそれぞれ配列番号 1 3 3 ~ 1 3 5 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域の断片及びヒト抗体の L 鎖 C 領域の断片を含む、ヒト T F に対するヒト型化抗体の L 鎖に関する。ここで、C 領域としては C  $\kappa$  領域、ヒト抗体由来の F R 1 ~ 4 としては、それぞれヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 (F R 1)、ヒト抗体 X 9 3 6 2 5 (F R 2)、ヒト抗体 S 6 8 6 9 9 (F R



3)、ヒト抗体 Z 3 7 3 3 2 (F R 4) 由来のもの、そして C D R 1 ~ 3 としてはそれぞれ配列番号 1 3 6 ~ 1 3 8 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体の L 鎖及び H 鎖を含む、ヒト T F に対するヒト型化抗体に関する。

さらに、本発明は、ヒト T F に対するヒト型化抗体の作製方法に関する。ヒト型化の作製方法とは、H 鎖または L 鎖の抗原認識部位である C D R 1 ~ 3 の構造を支える F R 1 ~ 4 の選択方法に関する。すなわち、各 F R を一つの単位として、マウス抗体由来の F R と相同性の高いヒト抗体の F R を複数選択し、その F R を順次置換 ( s h u f f l e ) して所望の活性を有するヒト型化抗体の作製方法に関する。

さらに詳しくは、本発明のヒト型化抗体の製造方法の一例においては、非ヒト由来の相補性決定領域 ( C D R ) 及び天然ヒト抗体由来のフレームワーク領域 ( F R ) を有する免疫原性を低減させた天然ヒト型化抗体の製造方法において、

( 1 ) 目的とする抗原に対して反応性の非ヒトモノクローナル抗体を用意し、

( 2 ) 前記 ( 1 ) のモノクローナル抗体中の F R のアミノ酸配列に対して高い相同性を有するヒト抗体を複数用意し、

( 3 ) 前記 ( 2 ) における 1 種類のヒト抗体の 4 個の F R を前記 ( 1 ) の非ヒトモノクローナル抗体の対応する F R により置換して第一のヒト型化抗体を作製し、

( 4 ) 前記 ( 3 ) において作製したヒト型化抗体の抗原への結合性又は抗原の生物活性を中和する能力を測定し、

( 5 ) 前記 ( 3 ) において作製したヒト型化抗体中の 1 ~ 3 個の F R を、( 2 ) で用意したヒト抗体の内、( 3 ) で使用したものと

は異なるヒト抗体の対応するFRにより置換して第二のヒト型化抗体を作製し、

(6) 前記(5)で作製した第二のヒト型化抗体と前記(3)で得た第一のヒト型化抗体とを、抗原に対する結合性、又は抗原の生物活性を中和する能力について比較し、好都合な活性を示すヒト型化抗体を選択し、

(7) 前記(6)で選択されたヒト型化抗体について、前記(3)～(6)の段階を実施し、そして

(8) 前記(1)における非ヒトモノクローナル抗体と同等の活性を有するヒト型化抗体が得られるまで前記(3)～(6)の段階を反復する、  
ことを特徴とする。

ヒトTFに対する中和活性をある程度有するヒト型化抗体が得られれば、そのH鎖及びL鎖のV領域の特定のFRに対してさらに相同性の検索を行い、さらに相同性の高いヒト抗体を選択することが出来る。ここで得られたヒト抗体を上記の工程(2)の複数のヒト抗体群に加えて、さらに工程(3)～(6)を反復し、所望の活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

さらに、本発明は、ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコードするDNAに関する。H鎖V領域の断片及びL鎖V領域の断片のアミノ酸配列及びDNAとしては、それぞれ配列番号9又は15で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記キメラH鎖又はキメラL鎖をコードするDNAに関する。該H鎖をコードするDNAとしては例えば配列番号9で表される塩基配列を含むものが挙げられ、該L鎖をコードするDNAとしては配列番号15で表される塩基配列を含むものが挙

げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のH鎖V領域の断片又はL鎖V領域の断片をコードするDNAに関する。H鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられ、L鎖V領域の断片をコードするDNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、ヒト型化抗体のH鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82又は84で表されるいずれかのアミノ酸配列をコードするDNAを含む、ヒト型化抗体のH鎖DNAに関する。該DNAとしては、配列番号29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81又は83で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖をコードするDNAに関する。

さらに、本発明は、配列番号93、99、101、107又は109で表されるアミノ酸配列をコードする、ヒト型化抗体のL鎖DNAである。該DNAとしては配列番号92、98、100、106又は108で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

さらに、本発明は、前記いずれかのDNAを含む組換えベクターに関する。

さらに、本発明は、前記組換えベクターにより形質転換された形質転換体に関する。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を採取することを特徴とするヒトTFに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体の製造方法に関する。

さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物又はDIC治療剤に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化aバージョン/L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化aバージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図2は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化aバージョン/L鎖キメラ抗体、及びH鎖キメラ/L鎖ヒト型化aバージョン抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図3は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化aバージョン/L鎖ヒト型化aバージョン抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図4は、抗TFマウスモノクローナル抗体ATR-5、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンa/L鎖ヒト型化バージョンa抗体の、ヒトTFに対する中和活性を比較したグラフである。

図5は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンb/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンb/L鎖ヒト型化バージョンa抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図6は、H鎖キメラ/L鎖キメラ抗体、H鎖ヒト型化バージョンc/L鎖キメラ抗体、及びH鎖ヒト型化バージョンd/L鎖キメラ抗体の抗原結合活性を測定したグラフである。

図 7 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン c／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン d／L 鎖キメラ抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 8 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン a 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 9 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖キメラ／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖キメラ／L 鎖ヒト型化バージョン c 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 10 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖キメラ／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖キメラ／L 鎖ヒト型化バージョン c 抗体の、ヒト T F に対する中和活性の比較を示すグラフである。

図 11 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン c 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 12 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン c 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 13 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン d／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 14 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン

ン d / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 1 5 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン e / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン e / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 1 6 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン e / L 鎖キメラ抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 1 7 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン g / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 1 8 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン g / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 1 9 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b 3 / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン d 3 / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 0 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b 3 / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン d 3 / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 1 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン j / L 鎖キメラ抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 2 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン

ン j / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 3 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖キメラ抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン j / L 鎖キメラ抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 4 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン j / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 5 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖キメラ / L 鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H 鎖キメラ / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 6 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖キメラ / L 鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H 鎖キメラ / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 7 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 8 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 2 9 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン

ョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 3 0 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 1 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性を比較したグラフである。

図 3 1 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 3 2 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F のファクター X a 産生阻害活性）を比較したグラフである。

図 3 3 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（ファクター X 結合阻害活性）を比較したグラフである。

図 3 4 は、H 鎖キメラ / L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i / L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F の血漿凝固阻害活性）を比較したグラフである。



図 3 5 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の各種条件で処理したヒト T F への反応性を比較した図である。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

##### 1. ヒト T F に対するマウスモノクローナル抗体の作製

T F に対するマウスモノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマから T F 活性を特異的に阻害する抗体を産生するクローンを選択することにより調製される。

すなわち、ヒト胎盤より精製した T F を抗原として免疫したマウスの脾細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニングは、抗体の T F との結合能は T F 高発現細胞株 J 8 2 を用いた C e l l - E L I S A で、T F に対する中和能は凝固第 X 因子 ( F a c t o r X : F X ) の活性化に対する阻害活性を指標にした測定系で行った。その結果、T F / V I I a 複合体の F X 活性化を強く阻害する抗体 6 種を産生するハイブリドーマの樹立に成功した。

##### (1) 抗原の調製

動物の免疫に用いる T F としては、組換え D N A 法又は化学合成により調製した T F のアミノ酸配列の一部のペプチド、又はヒト胎盤由来の T F などが挙げられる。例えば、I t o らの方法 ( I t o T. ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993 ) に準じて行い精製したヒト胎

盤由来のTFを抗原として用いることができる。

得られたヒトTFは、アジュバントと混合し抗原として用いる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものも混合してもよい。

#### (2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた抗原を非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4～21日間間隔で免疫する。

最終の免疫日から2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、0.1～100 $\mu$ gが用いられる。

#### (3) 抗体価の測定

免疫した動物の免疫応答レベルを確認し、また、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択するため、免疫した動物の血中抗体価、又は抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する。

抗体検出の方法としては、公知技術、例えばEIA（エンザイムイムノアッセイ）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素連結イムノソルベントアッセイ）等が挙げられる。

#### (4) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ（骨髄腫）細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手

可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えばHAT培地）で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地に生育できないものである。

ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653)(J. Immunol., 123, 1548-1550, 1979), P3x63Ag8.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7, 1978), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. 6, 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D.H. Cell, 8, 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, M. らNature, 276, 269-270, 1978), F0 (de St. Groth, S.F. らJ. Immunol. Methods, 35, 1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med., 148, 313-323, 1978), R210 (GGalfre, G. らNature, 277, 131-133, 1979) 等が好適に使用される。

抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破碎物をPBS、DMEM、RPMI 1640等の培地又は緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体産生細胞を調製する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。

細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI 1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1～1:10で融合促進剤の存在下、30～37℃で1～15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるた

めには、平均分子量 1, 0 0 0 ~ 6, 0 0 0 のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

#### （５）ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地（H A T 培地など）を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、種々の測定系を組み合わせで行うことが出来る。例えば、C e l l - E L I S A のごとき抗原認識測定系や F a c t o r X a 活性を指標とした T F 中和活性測定系、血漿凝固阻害活性測定系のごとき中和活性測定系を組み合わせで所望の活性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。このようにして、例えば、A T R - 2、A T R - 3、A T R - 4、A T R - 5、A T R - 7 および A T R - 8 のごときモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得することが出来る。

#### （６）モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法

としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10～20%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地、DMEM培地、又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度）で2～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～4週間後に腹水又は血清を採取する。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製する。

## 2. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

### (i) mRNAの調製

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖V領域をコードするDNAのクローニングを行うため、回収されたハイブリドーマから公知の方法、例えばグアニジン-超遠心法（Chirgwin, J.M.ら、Biochemistry, (1979), 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, Pら(1987), 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech）に添付されたオリゴ（dT）-セルロース スパンカラム等によりmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia Biotech）を用いることにより、全RNAの抽出操作を経ずに、mRNAの調製を行うこともできる。

### (ii) cDNAの調製及び増幅

上記 (i) で得た mRNA から、逆転写酵素を用いて L 鎖及び H 鎖の V 領域における cDNA をそれぞれ合成する。cDNA の合成は、Oligo-dT プライマー又は L 鎖 C 領域若しくは H 鎖 C 領域とハイブリダイズする適当なプライマー (例えばキット添付の cDNA 合成プライマー) を用いることが出来る。

cDNA 合成反応は、前記 mRNA とプライマーとを混合し、逆転写酵素の存在下で例えば 52℃ で 30 分の反応を行う。

cDNA の増幅は、L 鎖及び H 鎖ともに 5'-AmplifINDER RACE kit (CLONTECH 社) を用いた 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. ら Proc. Natl. Acad. USA 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. ら Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) に基づく PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) にて行うことが出来る。すなわち、上記で合成した 2 本鎖 cDNA の両端に cDNA adapter を連結し、H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域の断片をコードする DNA (以下、L 鎖 V 領域の断片をコードする DNA を「L 鎖 V 領域の DNA」又は「L 鎖 V 領域をコードする DNA」と略記することもある (H 鎖 V 領域等についても同様)) について PCR を行う。

H 鎖 V 領域の DNA を増幅するためのプライマーとして、例えば 5'-側プライマーにはキット添付の Adapter primer 1 と 3'-側プライマーにはマウス抗体の H 鎖定常領域 MHC-G1 プライマー (配列番号 1) (ATR-2、ATR-3、ATR-4 および ATR-5) (C $\gamma$ 1 領域) あるいは MHC-G2a プライマー (配列番号 2) (ATR-7 および ATR-8) (C $\gamma$ 2a 領域) (S. T. Jones ら, Biotechnology, 9, 88, 1991) を用いることが出来る。また、L 鎖 V 領域の DNA を増幅するためのプライマーとして、例えば 5'-側プライマーにはキット添付の Adapter primer 1 と 3'-側プライマーにはマウス抗体の L 鎖  $\kappa$  鎖定常領域 (C $\kappa$  領域) プラ

イマー（例えば配列番号 3 で表される塩基配列を有する M K C プライマー）を用いることが出来る。

( i i i ) D N A の精製及び塩基配列の決定

P C R 産物について、公知手法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的とする D N A 断片を切り出した後、D N A の回収及び精製を行い、ベクター D N A に連結する。

D N A の精製は、フェノール及びクロロホルムで抽出するか(J. S ambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、市販のキット（例えばGENECLEAN II; B10101）を用いて行われる。D N A 断片を保持するためのベクター D N A には公知のもの（例えば pUC19、Bluescript等）を用いることができる。

前記 D N A と上記ベクター D N A とを、公知のライゲーションキット（宝酒造製）を用いて連結させ、組換えベクターを得る。次に、得られる組換えベクターを大腸菌 J M 1 0 9 コンピテントセル（ニッポンジーン）等に導入した後アンピシリン耐性コロニーを選抜し、公知方法に基づいてベクター D N A を調製する(J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。目的とする D N A の塩基配列は、上記ベクター D N A を制限酵素で消化した後、公知方法（例えばジデオキシ法）により決定する(J. Sambrook, et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。本発明では、自動塩基配列決定装置（DNA Sequencer 373A, Perkin-Elmer）を用いることができる。

( i v ) 相補性決定領域（C D R）

H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域は、抗原結合部位を形成し、その全般の構造は互いに類似性を有している。すなわち、それぞれ 4 つのフ

レームワーク領域（F R）部分が、3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域（C D R）により連結されている。F Rのアミノ酸配列は比較的良好に保存されているが、一方、C D R領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い（Kabat, E. A. ら、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）。

前記4個のF Rの多くの部分は、 $\beta$ -シート構造をとり、その結果3個のC D Rはループを形成する。C D Rは、ある場合には $\beta$ -シート構造の一部を形成することもある。従って、3個のC D RはF Rによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そしてF Rは対をなす領域の3個のC D Rと共に抗原結合部位を形成する。

このような事実に基づき、ヒトT Fに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をK a b a t らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベース（「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）にあてはめて、相同性を調べることによりC D R領域を見いだすことが出来る。

C D R領域の配列は、ヒト型化抗体を作製した際にヒトT Fに対する結合活性及び中和活性が保持される範囲内であれば、挿入、置換又は欠失による改変体も本発明に含まれる。例えば、配列番号133-138の各C D R又は配列番号139-141, 143-144, 145-147及び149-150のV領域中の各C D R領域との相同性が90～100%の配列であるものが挙げられる。好ましくは、相同性が95～100%の配列であるものが挙げられる。さらに好ましくは、相同性が98～100%の配列であるものが挙げられる。

### 3. キメラ抗体の発現ベクターの作製



マウスモノクローナル抗体のマウスL鎖（以下、抗体のL鎖又はH鎖を表す場合は、マウスについては「マウスL鎖」、ヒト抗体のH鎖については「ヒトH鎖」のように略記することもある。）及びH鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これらのマウスV領域をコードするDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させることによってキメラ抗ヒトTF抗体が得られる。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体C領域をコードする配列に連結することを含んでなる。あるいは、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域配列をヒト抗体C領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結することを含んでなる。

ヒト抗体C領域の断片は、任意のヒト抗体のH鎖C領域及びヒト抗体のL鎖C領域のものとすることができ、例えばヒトH鎖のものについてはC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3又はC $\gamma$ 4、及びL鎖のものについてはC $\lambda$ 又はC $\kappa$ を各々挙げることができる。

キメラ抗体の製造のためには、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む単一の発現ベクター（例えば、WO 94/11523 参照）を作製する。次に、この発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する（例えば、WO 91/16928 参

照)。単一の発現ベクターには、IgG1 $\kappa$ 型抗体発現ベクターN5KG1(V)及びIgG4 $\kappa$ 型抗体発現ベクターN5KG4Pを用いることができる。

(i) キメラ抗体H鎖の構築

キメラ抗体のH鎖発現ベクターは、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体のH鎖C領域をコードするDNAを含む適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。H鎖C領域としては、例えばC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3又はC $\gamma$ 4領域が挙げられる。

ここで、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを発現ベクターに挿入するにあたり、PCR法により該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするため該cDNAの開始コドン直前にKozakコンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)を有するように設計したPCRプライマー、及び、該cDNAの3'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を発現ベクターに導入することができる。

こうして構築したマウスH鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、H鎖C領域(C $\gamma$ 1あるいはC $\gamma$ 4)をコードするDNAを含むキメラH鎖発現ベクターを構築する。

(ii) キメラ抗体L鎖 $\kappa$ 鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターの構築

キメラ抗体のL鎖発現ベクターは、マウスL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体のL鎖C領域をコードするDNAを含む適

当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。L鎖C領域としては、例えばC $\kappa$ 、C $\lambda$ 領域が挙げられる。

マウスL鎖V領域をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築するにあたり、PCR法により、該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5' -末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするためのKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、3' -末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を該cDNAに導入する。

こうして構築したマウスL鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、L鎖C領域(C $\kappa$ 領域)をコードするDNAを含むキメラL鎖発現ベクターを構築する。

#### 4. ヒト型化抗体の作製

##### (1) ヒト抗体との相同性検索

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されているヒト型化抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖のV領域を、Data Bankを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較する。また、同時にKabataらにより、抗体のFRの長さ、アミノ酸の相同性等によって分類されたヒト抗体のサブグループ(HSG: Human subgroup)(Kabat, E. A. ら、US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Office s, 1991)との比較を行う。

ヒトH鎖V領域の場合は、KabataらによるHSG分類により

、H S G I ～IIIに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域は、H S G Iのコンセンサス配列と67.8%のホモロジーを有する。一方、ヒトL鎖κ鎖V領域は、K a b a tらによるH S G 分類により、H S G I ～IVに分類することが出来、例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のL鎖κ鎖V領域は、H S G Iのコンセンサス配列と72.3%のホモロジーを有する。

従来の技術によりマウス抗体をヒト型化する場合には、必要によっては、ヒト型化V領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているマウス抗体のV領域のFRの一部のアミノ酸配列をヒトV領域のFRに移植する場合がある。しかしながら、マウス抗体のV領域FRのどのアミノ酸をヒト抗体V領域のFRに移植すべきかについては、一定の法則がない。従って、CDRの構造を保持するために必須のアミノ酸を特定することは、多くの努力を必要とする。

また、FRの一部にマウス抗体のV領域からヒトV領域に移植されたアミノ酸配列に対するヒト抗体ができる危険性が存在する。本発明では、ヒト型化した抗体に於いてCDRを除く全てのアミノ酸配列をヒト抗体由来のアミノ酸配列とするために、CDRの立体構造を保持するために必要な四個のFR（FR1～4）について、一つのFRを単位として、データベース上に存在するマウス抗体のFRと相同性の高いヒト抗体のFRを検索した。以下に、モノクローナル抗体ATR-5のH鎖及びL鎖のV領域の各FRについて、データベースと相同性検索した結果を示す。

表 1

FRのNo	アクセッションNo	マウス抗体H鎖V領域の それぞれのFRとのホモロ ジー (%)	配列番号
H鎖FR1	L39130	53.0	110
H鎖FR2	L39130	92.9	111
	P01742	71.4	112
	Z80844	78.6	113
H鎖FR3	L39130	62.5	114
	Z34963	71.9	115
	P01825	53.1	116
	M62723	68.8	117
	Z80844	68.8	118
	L04345	65.6	119
	S78322	75.0	120
	Z26827	56.3	121
	U95239	65.6	122
	L03147	65.6	123
H鎖FR4	L39130	90.9	124

表 2

FRのNo	アクセッションNo	マウス抗体L鎖V領域の それぞれのFRとのホモロ ジー (%)	配列番号
L鎖FR1	Z37332	78.3	125
L鎖FR2	Z37332	80.0	126
	S65921	80.0	127
	X93625	80.0	128
L鎖FR3	Z37332	71.9	129
	S68699	75.0	130
	P01607	71.9	131
L鎖FR4	Z37332	90.0	132

## (2) ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計

ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域の各FRを選択することである。また、FR shuffleにおいては、それぞれのFRにおいて、バラエティーの高いヒト抗体V領域FRを選択する必要がある。

本発明においては、モノクローナル抗体ATR-5に関しては、H鎖については、マウス抗体H鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR2については3種類、FR3については10種類のヒト抗体V領域FRを選択した。L鎖については、マウス抗体L鎖V領域全体と各FRとのホモロジー検索の結果から、FR2については3種類、FR3については3種類のヒト抗体V領域FRを選択する事が出来る。

ヒト型化H鎖およびL鎖V領域ともに、第一のバージョン（バージョンa: ver. a）として、マウスモノクローナル抗体ATR

－ 5 の H 鎖および L 鎖 V 領域とそれぞれホモロジーの高いヒト抗体 H 鎖および L 鎖 V 領域 L 3 9 1 3 0 と Z 3 7 3 3 2 を選択する事が出来る。これらのヒト型化抗体を作製するに当たり、FR shuffle を容易に行えるように各 C D R 内部及び F R の適当な部位に、適当な制限酵素認識部位を設計する事が出来る。こうすることにより、いずれかの F R のみを容易に入れ替えることが可能になる。

例えばヒト型化 H 鎖 C D R 1 の制限酵素 E c o T 2 2 I 認識部位、C D R 2 の制限酵素 B a l I 認識部位、C D R 3 の制限酵素 N c o I 認識部位および F R 3 の制限酵素 X h o I 認識部位、例えばヒト型化 L 鎖 C D R 1 の制限酵素 A f l I I 認識部位、C D R 2 の制限酵素 S p e I 認識部位、C D R 3 の制限酵素 P s t I 認識部位および F R 3 の制限酵素 A c c I I I 認識部位である。

このように設計したバージョン a を基にして、それぞれの F R について FR shuffle を行い、所望の活性を有するヒト型化抗体を作製する事が出来る。

### (3) ヒト型化抗体 V 領域の断片の作製

本発明のヒト型化抗体は、該抗体の C 領域、及び V 領域の F R がヒト抗体由来のものであり、V 領域の C D R がマウス抗体由来のものである。本発明のヒト型化抗体の V 領域の断片は、鑄型となるヒト抗体の D N A 断片が入手可能ならば、P C R 法による C D R ーグラフティングと呼ばれる手法により作製することができる。「C D R ーグラフティング」とは、マウス由来の C D R をコードする D N A 断片を作製し、これを鑄型となるヒト抗体の C D R と入れ換える手法をいう。

また、鑄型となるヒト抗体の D N A 断片が入手できない場合は、データベースに登録されている塩基配列を D N A 合成機で合成し、P C R 法によりヒト型化抗体 V 領域を作製することができる。さら

に、アミノ酸配列のみデータベースに登録されている場合は、そのアミノ酸配列を基に、Kabat, E.A.らの報告(US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)している抗体のコドン使用頻度に基づいて、全塩基配列を類推することができる。この塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域の断片を作製することができる。

(i) ヒト型化H鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの構築

本発明では、ヒト型化抗体の鋳型とするヒト抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化H鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体ATR-5のH鎖V領域と高い相同性(ホモロジー)を有するL39130をヒト型化H鎖V領域バージョン“a”として作製することが出来る。ヒト型化H鎖V領域バージョン“a”を作製するためには、例えば配列番号22～26に示す5本のプライマー及び配列番号27、28に示す2本の外部プライマーに分けて使用する。

CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S(配列番号22)、hR5Hv2S(配列番号23)及びhR5Hv4S(配列番号24)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーhR5Hv3A(配列番号25)及びhR5Hv5A(配列番号26)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18-35bpの相補的配列を有する。hR5Hv1SはKozakコンセンサス配列(Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)およびSalI認識部位を有するように、またhR5Hv5AはNheI認識部位を有するように設計す



る。また外部プライマー h R 5 H v P r S (配列番号 27) 及び h R 5 H v P r A (配列番号 28) は C D R グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S 及び h R 5 H v 5 A とホモロジーを有する。

P C R 法を用いて、5 本のプライマーをアセンブリさせ完全長の c D N A 合成し、さらに外部プライマーを加え D N A の増幅を行う。P C R 法によるアセンブリとは、h R 5 H v 1 S、h R 5 H v 2 S、h R 5 H v 4 S、h R 5 H v 3 A 及び h R 5 H v 5 A とがその相補的配列によりアニーリングし、完全長のヒト型化 H 鎖 V 領域の D N A が合成されることを指す。

ヒト抗体 H 鎖 C 領域は任意のヒト H 鎖 C 領域であることができ、例えばヒト H 鎖 C  $\gamma$  1、C  $\gamma$  2、C  $\gamma$  3 又は C  $\gamma$  4 を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体 H 鎖 V 領域の D N A は、任意のヒト抗体 H 鎖 C 領域、例えばヒト H 鎖 C 領域 C  $\gamma$  1 または C  $\gamma$  4 の D N A と連結することができる。キメラ抗体 H 鎖の構築で述べたように、適当な制限酵素にて処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト H 鎖 C 領域をコードする D N A と連結し、ヒト型化 H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域の D N A を含む発現ベクターを作製する。

#### ( i i ) ヒト型化 L 鎖 V 領域をコードする D N A 及び発現ベクターの構築

本発明では、H 鎖 V 領域をコードする D N A の場合と同様、鋳型となるヒト抗体の L 鎖 V 領域の遺伝子をデータベースから入手し、ヒト型化 L 鎖 V 領域をコードする D N A の全塩基配列を D N A 合成機で合成し、P C R 法により構築することが出来る。例えば、マウス抗ヒト T F モノクローナル抗体 A T R - 5 の L 鎖 V 領域と高い相同性 (ホモロジー) を有する Z 3 7 3 3 2 をヒト型化 L 鎖 V 領域バ

ージョン “a” として作製することが出来る。

ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “a” を作製するためには、CDR グラフティングプライマー h 5 L v 1 S (配列番号 8 5) 及び h 5 L v 4 S (配列番号 8 6) はセンス DNA 配列を、CDR グラフティングプライマー h 5 L v 2 A (配列番号 8 7)、h 5 L v 3 A (配列番号 8 8) 及び h 5 L v 5 A (配列番号 8 9) はアンチセンス DNA 配列を有し、各プライマーの両端に 20 b p の相補的配列を有する。プライマー h 5 L v 1 S は、K o z a k コンセンサス配列 (Kozak, M, ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) および制限酵素 B g l I I 認識部位を有するように、また h 5 L v 5 A は制限酵素 S p l I 認識部位を有するように設計する。また、外部プライマー h 5 L v S (配列番号 9 0) 及び h 5 L v A (配列番号 9 1) は CDR グラフティングプライマー h 5 L v 1 S 及び h 5 L v 5 A とホモロジーを有する。

ヒト型化 H 鎖 V 領域と同様に、PCR 法を用いて、5 本のプライマーをアセンブリさせ完全長の cDNA 合成し、さらに外部プライマーを加え DNA の増幅を行うことが出来る。

ヒト抗体 L 鎖 C 領域は任意のヒト L 鎖 C 領域であることができ、例えばヒト L 鎖 C  $\lambda$  や C  $\kappa$  を挙げることができる。

前記のようにして構築したヒト型化抗体 L 鎖 V 領域の DNA は、任意のヒト抗体 L 鎖 C 領域、例えばヒト L 鎖 C  $\kappa$  や C  $\lambda$  領域のものと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト L 鎖  $\kappa$  鎖 C 領域をコードする DNA と連結し、ヒト型化 L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖  $\kappa$  鎖 C 領域をコードする DNA を含む発現ベクターを作製する。

前記のようにして、ヒト型化抗体の V 領域断片が作製されても、

該 V 領域断片が抗体としての活性（抗原に対する結合活性、中和活性等）を有するか否かは必ずしも明らかではない。そのため、ヒト型化 H 鎖との組み合わせにより C O S - 7 のごとき動物細胞で発現させ、活性の有無を検討する必要がある。

（ i i i ） ヒト型化抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の F R shuffle

本発明者は、作製したヒト型化 H 鎖及び L 鎖 V 領域を含むヒト型化抗体を C O S - 7 のごとき動物細胞で一過性に発現させ、抗原結合活性及び中和活性について検討した結果、抗原結合活性及び中和活性を有するものの、キメラ抗体と比較して十分でないことがことが判明した。

本発明者は、ヒト型化 H 鎖及び L 鎖 V 領域の各 F R を順次 shuffle することにより、この問題を解決する事が出来る。F R の shuffle に用いるヒト抗体は、既存のデータベースより選択する事が出来る。選択したヒト抗体の F R は、データベースで明らかになっている塩基配列を基に、D N A 合成機により合成することが出来る。この際、前記のように、C D R もしくは F R に設計した制限酵素認識配列を付加することにより、上記で作製したヒト型化抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の F R と、容易に shuffle することが出来る。このようにして作製したヒト型化抗体の活性を調べることにより、所望する抗原結合活性並びに中和活性を有するヒト型化抗体を得ることが出来る。

例えば、ヒト型化抗体 V 領域 H 鎖 F R 3 をヒト抗体 Z34963 (GenBank, Borretzen M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 12917-12921, 1994) 由来の F R 3 に shuffle する事が出来る。

F R - シャッフリングプライマー F 3 R F F S （配列番号 3 5）および F 3 R F B S （配列番号 3 6）はセンス D N A 配列を有し、F 3 R F F A （配列番号 3 7）および F 3 R F B A （配列番号 3 8）

) はアンチセンスDNA配列を有する。FR-シャッフリングプライマーF3RFFS、F3RFB S、F3RFFA、F3RFB AはDNA合成機で合成することが出来る。

F3RFFSとF3RFFA、F3RFB SとF3RFB Aをアニールさせ、それぞれB a l IおよびX h o I、N c o IおよびX h o Iで消化した。これらをB a l IおよびN c o Iで消化することにより調製したプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C ( B a l I / N c o I ) に導入し、塩基配列を確認することにより正しい配列を有するプラスミドを得ることが出来る。このようにして得られたヒト型化抗体H鎖を含むプラスミドをh A T R 5 H v b / C V I D E C と命名し、プラスミドh A T R 5 H v b / C V I D E C に含まれるヒト型化H鎖をバージョン“b”とする。その塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号39に示し、バージョン“b”のアミノ酸配列を配列番号40に示す。

同様にして、データベースから選択した他のヒト抗体V領域H鎖およびL鎖由来のFRについても、ヒト型化抗体V領域H鎖及びL鎖のFRと shuffleすることが出来る。

ヒト型化抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域のFRを shuffleするためのさらに好ましいヒト抗体を選択するためには、以下のようにして行うことが出来る。すなわち、ヒト型化抗体H鎖バージョン“b”とキメラ抗体L鎖の組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の中和活性を有する。しかしながら、ヒト型化抗体H鎖バージョン“b”とヒト型化抗体L鎖バージョン“a”との組み合わせでは、キメラ抗体あるいはマウス抗体より中和活性が低下している。

このような場合に、FRを s h u f f l e するため候補とするヒト抗体を選択するためには、例えば、ヒト型化抗体H鎖バージョン

“b”のFR3（アクセッションNo. Z34963：配列番号115）に対する相同性検索を行い、この配列と相同性の高いヒト抗体を選択することが出来る。例えば、このようにして選択したヒト抗体H鎖V領域FR3では、U95239（配列番号122）やL03147（配列番号123）が挙げられる。

このようにして作製したヒト型化抗体V領域H鎖のアミノ酸配列を表3及び表4に示し、そしてヒト型化抗体V領域L鎖のアミノ酸配列を表5に示す。

表 3  
H鎖 V領域のアミノ酸配列

	FR1			CDR1	FR2	CDR2		
	1	2	3		4	5	6	
L39130(a)	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	12345678901234567890	012A3456789012345		
Z34963(b)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASCFNIK	DYYMH	WVKQRPQGQGLEWIG	CNDPANGHSMYD	PKFQG			
M30885(c)	---	---	---	---	---	---	---	---
M62723(d)	---	---	---	---	---	---	---	---
Z80844(e)	---	---	---	---	---	---	---	---
L04345(f)	---	---	---	---	---	---	---	---
S78322(g)	---	---	---	---	---	---	---	---
Z26827(h)	---	---	---	---	---	---	---	---
U95239(i)	---	---	---	---	---	---	---	---
L03147(j)	---	---	---	---	---	---	---	---
P01742(b1)	---	---	---	---	-R-A-	-M-	---	---
P01742(d1)	---	---	---	---	-R-A-	-M-	---	---
Z80844(b3)	---	---	---	---	-R-A-	---	---	---
Z80844(d3)	---	---	---	---	-R-A-	---	---	---

表 4

## H 鎖 V 領域のアミノ酸配列 (続き)

	FR3			CDR3	FR4
	7	8	9	10	11
	67890123456789012ABC345678901234	56789012	34567890123	56789012	34567890123
L39130(a)	RAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCAR	DSCYAMDY	WCQCTLVTVSS		
Z34963(b)	-VTI--D--TNT--M-L---RS--T-I-----				
M30885(c)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T-----				
M62723(d)	-VTI--DE-T-T--M-L---RS-----F----				
Z80844(e)	-VSI--DE-TK---M-LN--RS--T--F-----				
L04345(f)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T-----				
S78322(g)	K-T---DE-S-T--MQL---RS-----S----				
Z26827(h)	-VTMS-DK-S-A---QWT--KAS-T-I-F----				
U95239(i)	-VTI--D--T-TVFM-L---RS-----T-----				
L03147(j)	-VTF--D---NT--M-LR--RSA-T-----				
P01742(b1)	-VTI--D--TNT--M-L---RS--T-I-----				
P01742(d1)	-VTI--DE-T-T--M-L---RS-----F----				
Z80844(b3)	-VTI--D--TNT--M-L---RS--T-I-----				
Z80844(d3)	-VTI--DE-T-T--M-L---RS-----F----				

表 5

## L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1	FR2	CDR2
	1	2	3	4	5
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789	0123456
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD
S68699(b)	-----		-----	-----	-----
P01607(c)	-----		-----	-----	-----
S65921(b1)	-----		-----	-F-----S--T---	-----
X93625(b2)	-----		-----	-----E---S---	-----

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	10
	78901234567890123456789012345678			901234567	8901234567
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS			LQHGESP	YTFGGGTKVEIK
S68699(b)	-----Y-----			-----	-----
P01607(c)	-----Y-----I-----			-----	-----
S65921(b1)	-----Y-----			-----	-----
X93625(b2)	-----Y-----			-----	-----

前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖及びL鎖V領域各バージョンは、任意のヒト抗体H鎖C領域およびL鎖C領域、例えばそれぞれヒトH鎖C $\gamma$ 4およびヒトL鎖C $\kappa$ 領域のDNAと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトH鎖C $\gamma$ 4およびヒトL鎖C $\kappa$ 領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化H鎖及びL鎖V領域各バージョンをコードするDNAと、それぞれヒトH鎖C $\gamma$ 4及びヒトL鎖C $\kappa$ 領域をコードするDNAとを含む発現ベク



ターを作製する。

また、前記のようにして構築したヒト型化抗体 H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA と、ヒト型化 L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA とを、単一の発現ベクター（例えば、WO 94 / 1 1 5 2 3 参照）に導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするヒト型化抗体を生産させることができる。

#### 5. キメラ抗体及びヒト型化抗体の製造

キメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するためには、H 鎖 V 領域及び H 鎖 C 領域をコードする DNA、並びに L 鎖 V 領域及び L 鎖 C 領域をコードする DNA を単一ベクターに連結し、適当な宿主細胞を形質転換し、抗体を産生させることができる。すなわち、キメラ抗体の発現には、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、クローニングされた cDNA に存在するマウスリーダー配列並びにマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA と、マウスリーダー配列並びにマウス L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA とを単一の発現ベクター（例えば、WO 94 / 1 1 5 2 3 参照）に導入する。

ヒト型化抗体の発現には、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化 H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA と、ヒト型化 L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA とを単一の発現ベクター（例えば、WO 94 / 1 1 5 2 3 参照）に導入する。そして、これらのベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体を生産させる。

また、H鎖V領域およびL鎖V領域を含むそれぞれ2種類の発現ベクターを作製することが出来る。すなわち、キメラ抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。

あるいはまた、キメラ抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、マウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとで、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNA、並びにヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。

次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造する（例えば、WO 91 / 16928 参照）。

以上のようにして目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ

抗体又はヒト型化抗体は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体又はヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体又はヒト型化抗体は分離・精製することができる。

ヒトTFに対する本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するために、任意の発現系を使用することができる。例えば、真核細胞を用いる場合は動物細胞（例えば樹立された哺乳類細胞系）、真糸状菌細胞又は酵母細胞などが挙げられ、原核細胞を用いる場合は細菌細胞（例えば大腸菌細胞等）などを使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウィルス前期(human cytomegalovirus immediate early; HCMV)プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HC $\gamma$ 1, HCMV-VL-HCK等であって、pSV2neoに由来するもの(WO92-19759)が含まれる。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV40)などのウィルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 $\alpha$ (HEF-1 $\alpha$ )などの

哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法(Nature, 277, 108, 1979)、また、HEF-1 $\alpha$ プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S.らの方法(Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990)に従えば容易に実施することができる。

複製起原としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホストトランスフェラーゼAPH(3')II又はI(neo)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子等を含むことができる。

## 6. キメラ抗体及びヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性の評価

### (1) ELISAによる抗体の濃度測定

得られた精製抗体の濃度の測定は、ELISAにより行うことができる。

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製する。ELISA用96穴プレート(例えばMaxisorp, NUNC)の各穴を例えば1 $\mu$ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG $\gamma$ 抗体(BioSource)100 $\mu$ lを固相化する。

200 $\mu$ lの希釈バッファー(以下、DBと称する。例えば50mM Tris-HCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1M NaCl、0.05% Tween 20、0.02% NaN<sub>3</sub>、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH 7.2)でブロッキングの後、キメラ抗体、若しくはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞若

しくはCHO細胞の培養上清、又は精製キメラ抗体、若しくはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加える。次にアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体100 $\mu$ lを加え、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定する。濃度測定のスランダーとしてIgG4 $\kappa$  (The Binding Site)を用いることができる。

## (2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製する。ヒト膀胱癌細胞J82(ATCC HTB-1)を、細胞培養用96穴プレートの60穴に1 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞数で播き込む。これをCO<sub>2</sub>インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させる。培養液を捨て、300 $\mu$ lのPBSで各穴を2回洗浄する。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に100 $\mu$ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化する。

PFA/PBSを捨て、300 $\mu$ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250 $\mu$ lのDBでブロッキングする。キメラ抗体またはヒト型化抗体を含む培養上清、あるいは精製したキメラ抗体またはヒト型化抗体をDBにて段階希釈して100 $\mu$ lを各穴に加え、室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG $\gamma$ 抗体(Bio Source)100 $\mu$ lを加える。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で測定する。

## (3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) によるファクターXa産生阻害活性を指標に測定する事が出来る。すなわち、1.25 mg/ml のThromborel S 10  $\mu$ l と適当な濃度に希釈した抗体10  $\mu$ l に緩衝液 (5 mMのCaCl<sub>2</sub>、0.1%のBSAを含むTBS) 60  $\mu$ l を加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させる。

これに3.245  $\mu$ g/ml のヒトファクターX (セルサス・ラボラトリーズ) および82.5 ng/ml のヒトファクターVIIa (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ10  $\mu$ l 加え、さらに室温で1時間反応させる。0.5 MのEDTAを10  $\mu$ l 加え、反応を停止させ、発色基質溶液を50  $\mu$ l 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405 / 655 nmの吸光度を測定する。室温で1時間反応させ、再度405 / 655 nmの吸光度を測定する。抗体無添加の1時間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出することにより、中和活性を測定する。

発色基質溶液はテストチーム発色基質S-2222 (Chromogenicix) を添付文書に従い溶解し、精製水で2倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と1:1で混和し調製する。

#### 7. ヒト型化抗体と可溶性TFとの相互作用による反応速度論的解析

BIA COREによって本発明の抗TF抗体のkinetics parameter、すなわち解離定数 (KD)、解離速度定数 (k<sub>diss</sub>) 及び結合速度定数 (k<sub>ass</sub>) を測定することができる。

組換え型ProteinGをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合

させ、抗原として精製した組換え型TF（1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶性TF）（以下、可溶性TFと称す）を用い、種々の濃度に調製した可溶性TFをアナライトとする。得られたセンサーグラムから、カインेटイクスパラメーター（解離速度定数 $k_{dis}$ 及び結合速度定数 $k_{as}$ ）を算出することによって解離定数を求めることができる。速度論的解析に関しては、「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(karlsson, R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.)などを参考にすることができる。

本発明の抗TF抗体は、解離定数(KD)が小さい値であるほど中和活性を有する点で好ましい。本発明の抗TF抗体において、KD値は $2.30 \times 10^{-8}$  [1/M] 以下であることが好ましく、 $2.30 \times 10^{-9}$  [1/M] 以下であることがより好ましく、 $1.17 \times 10^{-9}$  [1/M] 以下のものが最も好ましい。

また、KD値は解離速度定数( $k_{dis}$ )及び結合速度定数( $k_{as}$ )の2つのパラメーターから決定される( $KD = k_{dis} / k_{as}$ )。したがって、 $k_{dis}$ の値が小さく、 $k_{as}$ の値が大きければ、KD値が小さくなることは明らかである。

具体的には、本発明の抗TF抗体の場合、 $k_{dis}$ の値が $9.52 \times 10^{-3}$  [1/sec] 以下であればよい。好ましくは、 $k_{dis}$ の値が $9.52 \times 10^{-4}$  [1/sec] 以下であり、最も好ましくは $6.35 \times 10^{-4}$  [1/sec] 以下である。

一方、 $k_{as}$ の値は $4.15 \times 10^4$  [1/M·sec] 以上であればよい。好ましくは、 $k_{as}$ の値が $4.15 \times 10^5$  [1/M·sec] 以上であり、最も好ましくは $4.65 \times 10^5$  [1/M·sec] 以上である。

さらに、 $k_{diss}$ の値が $9.52 \times 10^{-3} [1/sec]$ 以下であり、かつ、 $k_{ass}$ の値が $4.15 \times 10^4 [1/M \cdot sec]$ 以上の抗TF抗体も好ましい。

さらに具体的には、本発明の抗TF抗体は、KD値が $1.09 \times 10^{-10} \sim 2.30 \times 10^{-8} [1/M]$ の範囲であり、 $1.09 \times 10^{-9} \sim 2.30 \times 10^{-9} [1/M]$ のものが好ましく、 $1.09 \times 10^{-9} \sim 1.39 \times 10^{-9} [1/M]$ のものが最も好ましい。

また、 $k_{diss}$ 値が $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-3} [1/sec]$ の範囲であり、 $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-4} [1/sec]$ のものが好ましく、 $5.06 \times 10^{-4} \sim 6.49 \times 10^{-4} [1/sec]$ のものが最も好ましい。

そして $k_{ass}$ 値は、 $4.15 \times 10^4 \sim 5.44 \times 10^5 [1/M \cdot sec]$ の範囲であり、 $4.15 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5 [1/M \cdot sec]$ のものが好ましく、 $4.65 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5 [1/M \cdot sec]$ のものが最も好ましい。

これらのKD値、 $k_{diss}$ 値及び $k_{ass}$ 値は、BIACORE以外にもスキャッチャード解析、あるいはBIACOREなどの表面プラズモン共鳴センサー等により得ることができるが、BIACOREを用いて得ることが好ましい。

#### 8. ヒト型化抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットブロットハイブリダイゼーション法によって、本発明のヒト型化抗体の非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TFへの反応性を検討することができる。

TFはヒト組織より精製したもの、もしくはCHO細胞の哺乳動物細胞で発現させ精製したもの等を用い、検討できる。また、変性剤には尿素の代わりにグアニジン塩酸塩やSDS等を用いることができ、還元剤にはDTTの代わりに2-メルカプトエタノールなど



のSH還元試薬を用いることもできる。ヒト型化抗体の検出には様々な物質で標識された抗ヒトIgG抗体を用いることができる。ここでいう標識物質は例えば、放射性物質、ビオチン、FITC等の蛍光物質、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素などである。本発明の抗TF抗体は、非変性TF、非還元下変性TFならびに還元下変性TFのいずれにも反応する。

#### 9. ヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤

ヒトTFに対するヒト型化抗体の治療効果を確認するには、ヒト型化抗ヒトTF抗体を高DIC症状を呈した動物に投与し、DICの指標を測定することによりその治療効果を確認することができる。

本発明で使用される抗体は、ヒトTFに対するヒト型化された抗体である。この抗体は、ヒトTFに結合することにより、ヒトTFの活性を中和する抗体であり、特に、好ましくはヒト型化されたATR5抗体が挙げられる。ヒト型化ATR5抗体の作製方法は、実施例に記載されている。

本発明で使用される抗体は、塩析法、HPLC等を用いたゲル濾過法、プロテインAカラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等の通常の精製手段を組み合わせ高純度に精製することができる。このように精製された抗体は、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA、ELISA)、あるいは蛍光抗体法(Immunofluorescence Analysis)等の通常の免疫学的手段により、高精度にヒトTFを認識することを確認できる。

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤は、非経口的に全身又は局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内

注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり10mg/body、好ましくは1～1000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。

本発明のTFに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及びDIC治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択されるが、これらに限定されるものではない。

#### 発明の効果

本発明により、ヒトTFに対するキメラ抗体およびヒト型化抗体ならびにヒト型化抗体の作製方法が提供される。これらの抗体は、ヒトにおける抗原性が低いことから、治療薬として有用である。

## 実施例

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

### 実施例 1. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域 をコードするDNAのクローニング

#### (1) mRNAの調製

ハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5 (IgG1 $\kappa$ )、ATR-7、及びATR-8 (IgG2a $\kappa$ ) からmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech)を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)-セルローススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。

#### (2) マウス抗体V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製及び増幅

##### (i) H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit(CLONTECH)を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。

前記のようにして調製したmRNA約1 $\mu$ gを鋳型として、キット添付のcDNA synthesis primerを加え、逆転写酵素と42℃、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNase Hで16℃、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16℃、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフ

ェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

T4 DNAリガーゼで16℃で一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNAアダプターを連結した。反応混合液は10mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1mM

EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMHC-G1プライマー（配列番号1）（ATR-2、ATR-3、ATR-4及びATR-5）あるいはMHC-G2aプライマー（配列番号2）（ATR-7及びATR-8）(S.T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

ATR-2、3、4及び5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100μl中に120mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM KCl、6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl<sub>2</sub>、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）、30～50 pmoleのアダプタープライマー1並びにMHC-G1プライマー、及びcDNAアダプターを連結したcDNAの反応混合物1～5μlを含有する。

PCRはいずれもDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

#### (ii) L鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M.A. et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5' - R A C E 法には Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製した mRNA 約 1  $\mu$ g を鋳型として cDNA 合成プライマーを加え、逆転写酵素と 42°C、60 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

これを DNA ポリメラーゼ I、DNA リガーゼ、RNase H で 16°C、1.5 時間、T4 DNA ポリメラーゼで 16°C、45 分間反応させることにより、2 本鎖 cDNA を合成した。2 本鎖 cDNA をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNA リガーゼで 16°C で一夜反応することにより、2 本鎖 cDNA の両端に cDNA アダプターを連結した。反応混合液は 10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1 mM EDTA 溶液で 50 倍に希釈した。これを鋳型として PCR により L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を増幅させた。5' - 側プライマーにはアダプタープライマー 1 を、3' - 側プライマーには MKC プライマー (配列番号 3) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

PCR 溶液は、100  $\mu$ l 中に 120 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、2.5 ユニットの KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、30~50 pmole のアダプタープライマー 1 並びに MKC プライマー、及び cDNA アダプターを連結した cDNA の反応混合物 1  $\mu$ l を含有する。

P C R は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

### (3) P C R 生成物の精製及び断片化

前記の P C R 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した D N A 断片をエタノール沈殿により回収した。D N A 断片を制限酵素 X m a I (New England Biolabs) により 37℃で1時間消化した。X m a I 消化混合物を2%から3%のNuSieve GTG アガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H鎖V領域として約500bp長、L鎖V領域として約500bp長のD N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、10mM T r i s - H C l (pH 8.0)、1mM E D T A 溶液(以下、T E と称す) 10μl に溶解した。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域及びL鎖V領域をコードする遺伝子を含むX m a I 消化D N A 断片と、X m a I で消化することにより調製したp U C 1 9 プラスミドベクターとをD N A ライゲーションキットv e r . 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。

次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml アンプシリンを含むL B 寒天培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Pr

ess, 1989) (以下、L B A 寒天培地と称す) 上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含有するL B 培地(以下、L B A 培地と称す) 3 ml あるいは4 ml で37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

#### (4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造) (配列番号4) 及びM13 Primer RV(宝酒造) (配列番号5) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7及びATR-8に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれATR-xHv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8) と命名し、そしてL鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれATR-xLv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8) と命名した。プラスミドATR-xHv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8) に含まれる各マウス抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号6から11に、プラスミドATR-xLv/pUC19 (x=2、3、4、5、7又は8) に含まれる各マウス抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む) をそれぞれ配列番号12から17に示す。

#### 実施例 2. キメラ抗体の構築

マウス A T R - 5 抗体 V 領域をヒト抗体 C 領域に連結したキメラ A T R - 5 抗体を作製した。A T R - 5 抗体 V 領域をコードする遺伝子をヒト抗体 C 領域をコードする発現ベクターに連結することにより、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

#### (1) キメラ抗体 H 鎖 V 領域の構築

ヒト抗体 H 鎖 C 領域をコードする発現ベクターに連結するために、A T R - 5 抗体 H 鎖 V 領域を P C R 法により修飾した。5' - 側プライマー c h 5 H S (配列番号 18) は V 領域をコードする D N A の 5' - 末端にハイブリダイズし、且つ K o z a k コンセンサス配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び制限酵素 S a l I の認識配列を有するように設計した。3' - 側プライマー c h 5 H A (配列番号 19) は J 領域をコードする D N A の 3' - 末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素 N h e I の認識配列を有するように設計した。

P C R 溶液は、100  $\mu$  l 中に 120 mM T r i s - H C l (p H 8.0)、10 mM K C l、6 mM (N H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、0.1% T r i t o n X-100、0.001% B S A、0.2 mM d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、1 mM M g C l<sub>2</sub>、2.5 ユニットの K O D D N A ポリメラーゼ (東洋紡績)、50 p m o l e の c h 5 H S プライマー並びに c h 5 H A プライマー、及び鋳型 D N A として 1  $\mu$  l のプラスミド A T R 5 H v / p U C 19 を含有する。P C R は D N A T h e r m a l C y c l e r 480 (Perkin-Elmer) を使い、94  $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55  $^{\circ}$ C にて 30 秒間、74  $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

P C R 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した D N A 断片をエタノール沈殿により回収した。D N A 断片を制限酵素 N h e I (宝酒造) により 37  $^{\circ}$ C で 1 時間消化し、次いで制



制限酵素 *SaI I* (宝酒造) により 37 °C で 1 時間消化した。この消化混合物を 3 % *NuSieve GTG* アガロース (*FM C Bio Products*) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 450 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20  $\mu$  l に溶解した。

クローニングベクターには制限酵素 *Nhe I*、*SaI I* 及び *SpI I*、*Bgl II* の認識配列を導入した改変 pUC19 ベクター (以下、*CVIDEC* と称す) を用いた。上記のようにして調製したマウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子断片と *Nhe I* 及び *SaI I* で消化することにより調製した *CVIDEC* ベクターを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16 °C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100  $\mu$  l に加え、氷上で 30 分間、42 °C にて 1 分間静置した。次いで 300  $\mu$  l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37 °C にて 1 時間インキュベートした後、100  $\mu$  g / ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37 °C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 3 ml で 37 °C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。この ATR-5 抗体 H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し

、5' - 側に S a l I 認識配列及び K o z a k コンセンサス配列、  
3' - 側に N h e I 認識配列を持つプラスミドを c h A T R 5 H v  
/ C V I D E C と命名した。

## (2) キメラ抗体 L 鎖 V 領域の構築

ヒト抗体 L 鎖 C 領域をコードする発現ベクターに連結するために、  
A T R - 5 抗体 L 鎖 V 領域を P C R 法により修飾した。5' - 側  
プライマー c h 5 L S (配列番号 20) は V 領域をコードする D N  
A の 5' - 末端にハイブリダイズし、且つ K o z a k コンセンサス  
配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 及び  
制限酵素 B g l I I の認識配列を有するように設計した。3' - 側プ  
ライマー c h 5 L A (配列番号 21) は J 領域をコードする D N A  
の 3' - 末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素 S p l I の認識配  
列を有するように設計した。

P C R 溶液は、100  $\mu$  l 中に 120 mM T r i s - H C l (p H 8.0)、10 mM K C l、6 mM (N H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、  
0.1% T r i t o n X-100、0.001% B S A、0.2 mM d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、  
1 mM M g C l<sub>2</sub>、2.5 ユニットの K O D DNA ポリメ  
ラーゼ (東洋紡績)、50 p m o l e の c h 5 L S プライマー並び  
に c h 5 L A プライマー、及び鋳型 D N A として 1  $\mu$  l のプラスミ  
ド A T R 5 L v / p U C 19 を含有する。P C R は DNA Thermal Cy  
cler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94  $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55  $^{\circ}$ C に  
て 30 秒間、74  $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

P C R 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅  
した D N A 断片をエタノール沈殿により回収した。D N A 断片を制  
限酵素 S p l I (宝酒造) により 37  $^{\circ}$ C で 1 時間消化し、次いで制  
限酵素 B g l I I (宝酒造) により 37  $^{\circ}$ C で 1 時間消化した。この消

化混合物を 3 % NuSieve GTGアガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 400 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、20  $\mu$ l の TE に溶解した。

上記のようにして調製したマウス L 鎖 V 領域をコードする遺伝子断片と S p l I 及び B g l II で消化することにより調製した C V I D E C ベクターを DNA ライゲーションキット v e r . 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100  $\mu$ l に加え、氷上で 30 分間、42  $^{\circ}$ C にて 1 分間静置した。次いで 300  $\mu$ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37  $^{\circ}$ C にて 1 時間インキュベートした後、100  $\mu$ g / ml L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37  $^{\circ}$ C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 ml で 37  $^{\circ}$ C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中の c DNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。この A T R - 5 抗体 L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含有し、5' - 側に B g l II 認識配列及び K o z a k コンセンサス配列、3' - 側に S p l I 認識配列を持つプラスミドを c h A T R 5 L v / C V I D E C と命名した。

### (3) キメラ抗体発現ベクターの構築

I D E C 社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。ベクターには I g G 1 型抗体発現ベクター N 5 K G 1 ( V ) 及び I g G 4 型抗体発現ベクター N 5 K G 4 P を用いた。発現ベクター N 5 K G 1 ( V ) あるいは N 5 K G 4 P のヒト抗体 H 鎖 C 領域の直前にある S a l I - N h e I 部位に A T R - 5 の H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を、ヒト抗体 L 鎖 C 領域の直前にある B g l I I - S p l I 部位に A T R - 5 の L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を連結することによって、キメラ A T R - 5 抗体発現ベクターを作製した。

( i ) H 鎖 V 領域の導入

プラスミド c h A T R 5 H v / C V I D E C を制限酵素 N h e I ( 宝酒造 ) により 3 7 ° C で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I ( 宝酒造 ) により 3 7 ° C で 3 時間消化した。この消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTG アガロース ( F M C BioProducts ) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 4 5 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 2 0 μ l に溶解した。

発現ベクター N 5 K G 1 ( V ) 及び N 5 K G 4 P を制限酵素 N h e I ( 宝酒造 ) により 3 7 ° C で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I ( 宝酒造 ) により 3 7 ° C で 3 時間消化した。この消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTG アガロース ( F M C BioProducts ) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9 0 0 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 6 0 μ l に溶解した。

上記のようにして調製した H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む

S a l I - N h e I DNA断片とS a l I及びN h e Iで消化したN 5 K G 1 ( V ) あるいはN 5 K G 4 PをDNAライゲーションキットv e r . 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 $\mu$ lに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 $\mu$ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 $\mu$ g/ml L B A寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラA T R - 5抗体H鎖をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれc h A T R 5 H v / N 5 K G 1 ( V )、及びc h A T R 5 H v / N 5 K G 4 Pと命名した。

( i i ) L鎖V領域の導入

プラスミドc h A T R 5 L v / C V I D E Cを制限酵素B g l I I (宝酒造)及びS p l I (宝酒造)により37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% N u S i e v e G T Gアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20 $\mu$ lのT Eに溶解した。

プラスミドc h A T R 5 H v / N 5 K G 1 ( V ) 及びc h A T R 5 H v / N 5 K G 4 Pを制限酵素B g l I I (宝酒造)及びS p l I (宝酒造)により37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を

1. 5 % NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9 4 0 0 b p 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE 2 0  $\mu$  l に溶解した。

上記のようにして調製した L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む S p l I - B g l I I DNA 断片と S p l I 及び B g l I I で消化した c h A T R 5 H v / N 5 K G 1 ( V ) あるいは c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P を DNA ライゲーションキット v e r . 2 ( 宝酒造 ) を用い、添付の処方に従い 1 6  $^{\circ}$  C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞 ( ニッポンジーン ) 1 0 0  $\mu$  l に加え、氷上で 3 0 分間、4 2  $^{\circ}$  C にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0  $\mu$  l の Hi-Competence Broth ( ニッポンジーン ) を加え 3 7  $^{\circ}$  C にて 1 時間インキュベートした後、1 0 0  $\mu$  g / m l L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、3 7  $^{\circ}$  C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を 5 0  $\mu$  g / m l アンピシリンを含有する 2  $\times$  Y T 培地 1 l で 3 7  $^{\circ}$  C にて一夜培養し、菌体画分から P l a s m i d M a x i K i t ( Q I A G E N ) を用いてプラスミド DNA を調製した。これらキメラ A T R - 5 抗体をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ c h A T R 5 / N 5 K G 1 ( V ) 、 c h A T R 5 / N 5 K G 4 P と命名した。

#### ( 4 ) C O S - 7 細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを C O S - 7 細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミド c h A T R 5 / N 5 K G 1 ( V ) あるいは c h A T R

5 / N 5 K G 4 P を G e n e P u l s e r 装置 ( B i o R a d ) を用いてエレクトロポレーションにより C O S - 7 細胞に形質導入した。ダルベッコ P B S ( - ) ( 以下、P B S と称す) 中に  $1 \times 10^7$  細胞 / m l の細胞濃度で懸濁されている C O S - 7 細胞 0 . 7 8 m l に、プラスミド  $50 \mu g$  を加え、1 , 5 0 0 V ,  $25 \mu F$  の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて 1 0 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を 5 % の U l t r a L o w I g G ウシ胎児血清 ( G I B C O ) を含有する D M E M 培地 ( G I B C O ) に懸濁し、1 0 . c m 培養皿を用いて C O <sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。2 4 時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地 H B C H O ( アーバインサイエンティフィック ) を加えた。さらに 7 2 時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

#### ( 5 ) 抗体の精製

C O S - 7 細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepharose Fast Flow ( Pharmacia Biotech ) を用いて以下のように精製した。

1 m l の rProtein A Sepharose Fast Flow をカラムに充填し、1 0 倍量の T B S を流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムに C O S - 7 細胞の培養上清をアプライした後、1 0 倍量の T B S によってカラムを洗浄した。

次に、1 3 . 5 m l の 2 . 5 m M H C l ( p H 3 . 0 ) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに 1 . 5 m l の 1 M T r i s - H C l ( p H 8 . 0 ) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ 1 0 0 ( A m i c o n ) を用いた限外濾過を 2 回行うことにより、1 5 0 m M N

a C lを含む50 mM T r i s - H C l (p H 7 . 6) (以下、T B Sと称す)に溶媒を置換し、最終的に約1.5 mlまで濃縮した。

#### (6) C H O安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、C H O - S - S F M I I無血清培地(GIBCO)に馴化したC H O細胞(D G 4 4)に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミドc h A T R 5 / N 5 K G 1 (V)あるいはc h A T R 5 / N 5 K G 4 Pを制限酵素S s p I (宝酒造)で切断して直鎖状DNAにし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール沈殿でDNAを回収した。直鎖状にしたプラスミドをGene P u l s e r装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりD G 4 4細胞に形質導入した。P B S中に $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているD G 4 4細胞0.78 mlに、プラスミド10  $\mu$ gを加え、1,500 V, 25  $\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞をヒポキサンチン・チミジン(G I B C O)を含有するC H O - S - S F M I I培地(GIBCO)に懸濁し、2枚の96穴プレート(F a l c o n)を用いてC O<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン(GIBCO)及び500  $\mu$ g/ml GENETICIN (G418Sulfate、GIBCO)を含有するC H O - S - S F M I I培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定E L I S Aにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。



### 実施例 3. ヒト型化抗体の構築

#### (1) ヒト型化抗体H鎖の構築

##### (i) ヒト型化H鎖バージョン“a”の構築

ヒト型化A T R - 5 抗体H鎖を、P C R法によるC D R - グラフティングにより作製した。ヒト抗体L 3 9 1 3 0 (DDBJ, Gao L. ら、未発表、1995) 由来のF Rを有するヒト型化A T R - 5 抗体H鎖バージョン“a”の作製のために7個のP C Rプライマーを使用した。C D R - グラフティングプライマーh R 5 H v 1 S (配列番号22)、h R 5 H v 2 S (配列番号23) 及びh R 5 H v 4 S (配列番号24) はセンスD N A配列を有し、そしてC D R グラフティングプライマーh R 5 H v 3 A (配列番号25) 及びh R 5 H v 5 A (配列番号26) はアンチセンスD N A配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に18 - 35 b pの相補的配列を有する。

h R 5 H v 1 SはK o z a k コンセンサス配列 (K o z a k, M, ら、J. M o l. B i o l. 196, 947 - 950, 1987) 及びS a l I 認識部位を有するように、またh R 5 H v 5 AはN h e I 認識部位を有するように設計した。また外部プライマーh R 5 H v P r S (配列番号27) はC D R グラフティングプライマーh R 5 H v 1 Sと、h R 5 H v P r A (配列番号28) はC D R グラフティングプライマーh R 5 H v 5 Aとホモロジーを有する。

C D R - グラフティングプライマーh R 5 H v 1 S、h R 5 H v 2 S、h R 5 H v 3 A、h R 5 H v 4 S 及びh R 5 H v 5 A、ならびに外部プライマーh R 5 H v P r S 及びh R 5 H v P r AはP h a r m a c i a B i o t e c hにより合成及び精製された。

P C Rは、K O D D N A ポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、98  $\mu$  l 中に120 m M T r i s - H C l (p H 8. 0)、10 m M K C l、6 m M (N H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、0. 1% T r i t o

n X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、CDR-グラフティングプライマーhR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S及びhR5Hv5Aをそれぞれ5 pmoleを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmoleの外部プライマーhR5HvPrS及びhR5HvPrAを加え、100 µlの系で同じ温度サイクルを25回行った。PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

約430 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量(ml/g)のTEを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水17 µlに溶解した。得られたPCR反応混合物をNheI及びSalIで消化し、NheI及びSalIで消化することにより調製したプラスミドベクターCVIDECに、DNAライゲーションキットver. 2(宝酒造)を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 µlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 µlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100 µg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培

地 3 m l で 3 7 ° C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中の c DNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

E c o T 2 2 I 認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度 C V I D E C にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v a / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “a” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 2 9 に示す。また、バージョン “a” のアミノ酸配列を配列番号 3 0 に示す。

( i i ) ヒト型化 H 鎖バージョン “b” 及び “c” の構築

バージョン “b” 及び “c” を F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “b” では F R 3 をヒト抗体 234963 (DDBJ、Borretzen M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 12917-12921, 1994) 由来のものに置換するため、F R 3 をコードする DNA プライマーを 4 個作製した。F R - シャッフリングプライマー F 3 R F F S (配列番号 3 1) 及び F 3 R F B S (配列番号 3 2) はセンス DNA 配列を有し、F 3 R F F A (配列番号 3 3) 及び F 3 R F B A (配列番号 3 4) はアンチセンス DNA 配列を有する。

F 3 R F F S と F 3 R F F A は互いに相補的な配列を有し、両端

に B a l I 及び X h o I の認識配列を有する。バージョン“c”では F R 3 をヒト抗体 P 0 1 8 2 5 (SWISS-PROT、Poljak R.J.ら、Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977)由来のものに置換するため、F R 3 をコードする D N A プライマーを 4 個作製した。F R -シャッフリングベクター F 3 N M F S (配列番号 3 5) 及び F 3 N M B S (配列番号 3 6) はセンス D N A 配列を有し、F 3 N M F A (配列番号 3 7) 及び F 3 N M B A (配列番号 3 8) はアンチセンス D N A 配列を有する。F 3 R F B S と F 3 R F B A は互いに相補的な配列を有し、両端に X h o I 及び N c o I の認識配列を有する。

F 3 R F F S、F 3 R F B S、F 3 R F F A、F 3 R F B A、F 3 N M F S、F 3 N M B S、F 3 N M F A 及び F 3 N M B A は P h a r m a c i a B i o t e c h により合成された。F 3 R F F S と F 3 R F F A、F 3 R F B S と F 3 R F B A をアニールさせ、それぞれ B a l I 及び X h o I、N c o I 及び X h o I で消化した。これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v b / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 3 9 に示す。また、バージョン“b”のアミノ酸配列を配列番号 4 0 に示す。

F 3 N M F S と F 3 N M F A、F 3 N M B S と F 3 N M B A をアニールさせ、それぞれ B a l I 及び X h o I、N c o I 及び X h o I で消化した。これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v c / C V I D E C と命名した。プラス

ミドhATR5Hv c / CVIDE Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号41に示す。また、バージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号42に示す。

(iii) ヒト型化H鎖バージョン“d”及び“e”の構築

バージョン“d”及び“e”をFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“d”ではFR3をヒト抗体M62723 (DDBJ、Pascual V.ら, J.Clin.Invest., 86, 1320-1328, 1990)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを4個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3EPS (配列番号43) はセンスDNA配列を有し、F3EPA (配列番号44) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

また外部プライマーF3PrS (配列番号45) 及びF3PrA (配列番号46) はFR-シャッフリングプライマーF3EPS及びF3EPAとホモロジーを有し、他のFR3のシャッフリングにも用いることができる。バージョン“e”ではFR3をヒト抗体Z80844 (DDBJ、Thomsett AR.ら, unpublished)由来のものに置換するため、FR3をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングプライマーF3VHS (配列番号47) はセンスDNA配列を有し、F3VHA (配列番号48) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3EPS、F3EPA、F3PrS、F3PrA、F3VHS及びF3VHAは Pharmacia Biotechにより合成された。

PCRは、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を用い、100  $\mu$  l

の反応混合液に  $1 \mu\text{M}$  の F R - シャッフリングプライマー F 3 E P S と F 3 E P A、又は F 3 V H S と F 3 V H A をそれぞれ  $5 \mu\text{l}$ 、 $0.2 \text{ mM}$  の d N T P s、 $1.0 \text{ mM}$  の M g C l<sub>2</sub>、 $2.5 \text{ U}$  の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して  $94^\circ\text{C}$  にて  $30$  秒間、 $50^\circ\text{C}$  にて  $1$  分間、 $74^\circ\text{C}$  にて  $1$  分間の温度サイクルで  $5$  回行い、さらに  $100 \text{ pmol}$  の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを  $25$  回行った。

P C R 法により増幅した DNA 断片を  $2\%$  の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。 $424 \text{ bp}$  長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、 $3$  倍量 ( $\text{ml/g}$ ) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その  $3$  分の  $1$  量を水  $14 \mu\text{l}$  に溶解した。得られた P C R 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C ( B a l I / N c o I ) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v d / C V I D E C 及び h A T R 5 H v e / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v d / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “d” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 49 に、バージョン “d” のアミノ酸配列を配列番号 50 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v e / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “e” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 51 に、バージョン “e” のアミノ酸配列を配列番号 52 に示す。

( i v ) ヒト型化 H 鎖バージョン “f” 及び “g” の構築

バージョン “f” 及び “g” は F R - シャッフリング法によって

バージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“f”はヒト抗体L04345 (DDBJ、Hillson JL. ら, J. Exp. Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR3に、バージョン“g”はS78322 (DDBJ、Bejcek BE. ら, Cancer Res., 55, 2346-2351, 1995) 由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“f”のFR-シャッフリングプライマーF3SSS (配列番号53) はセンスDNA配列を有し、F3SSA (配列番号54) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

バージョン“g”のFR-シャッフリングプライマーF3CDS (配列番号55) はセンスDNA配列を有し、F3CDA (配列番号56) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3SSS、F3SSA、F3CDS及びF3CDAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、100  $\mu$ lの反応混合液に1  $\mu$ MのFR-シャッフリングプライマーF3SSS及びF3SSAもしくはF3CDS及びF3CDAをそれぞれ5  $\mu$ lずつ、0.2 mMのdNTPs、1.0 mMのMgCl<sub>2</sub>、2.5 UのKOD DNAポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて30秒間、50℃にて1分間、74℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに100 pmolの外部プライマーF3PrS及びF3PrAを加え、同じ温度サイクルを25回行った。

PCR法により増幅したDNA断片を2%のNuSieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り、3倍量 (ml/g) のTEを添加し、フェノール抽出、フェ

ノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水14  $\mu$ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をB a l I及びN c o Iで消化し、これらをB a l I及びN c o Iで消化することにより調製したプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C ( B a l I / N c o I ) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをh A T R 5 H v f / C V I D E C及びh A T R 5 H v g / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 H v f / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“f”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“f”アミノ酸配列を配列番号57及び58に示す。また、プラスミドh A T R 5 H v g / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“g”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“g”のアミノ酸配列を配列番号59、60に示す。

#### (v) ヒト型化H鎖バージョン“h”の構築

バージョン“h”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“h”はヒト抗体Z26827 (DDBJ、Van Der Stoep ら, J. Exp. Med., 177, 99-107, 1993)由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“h”のFR-シャッフリングプライマーF3ADS (配列番号61) はセンスDNA配列を有し、F3ADA (配列番号62) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

F3ADS及びF3ADAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。PCRは、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、100  $\mu$ lの反応混合液に1  $\mu$ MのFR-シャッフリング



プライマー F 3 A D S 及び F 3 A D A をそれぞれ 5  $\mu$  l ずつ、0.2 mM の d N T P s、1.0 mM の M g C l<sub>2</sub>、2.5 U の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 94 °C にて 30 秒間、50 °C にて 1 分間、74 °C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 100 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 25 回行った。P C R 法により増幅した DNA 断片を 2 % の N u S i e v e G T G アガロース (F M C B i o . P r o d u c t s) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

424 b p 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 14  $\mu$  l に溶解した。得られた P C R 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v h / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v h / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “h” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 63 に示す。また、バージョン “h” のアミノ酸配列を配列番号 64 に示す。

#### (v i) ヒト型化 H 鎖バージョン “i” 及び “j” の構築

バージョン “i” 及び “j” は F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “i” はヒト抗体 U 9 5 2 3 9 (DDBJ, Manheimer-Lory A J., unpublished) 由来の F R 3 に、バージョン “j” は

L 0 3 1 4 7 (DDBJ、Collet TA.ら、Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 89, 10026-10030, 1992)由来のF R 3に置換するためF R 3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“i”のF R-シャッフリングプライマーF 3 M M S (配列番号6 5)はセンスDNA配列を有し、F 3 M M A (配列番号6 6)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は1 8 b pの相補的配列を有する。

バージョン“j”のF R-シャッフリングプライマーF 3 B M S (配列番号6 7)はセンスDNA配列を有し、F 3 B M A (配列番号6 8)はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は1 8 b pの相補的配列を有する。F 3 M M S、F 3 M M A、F 3 B M S及びF 3 B M Aは Pharmacia Biotechにより合成及び精製された。P C Rは、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer)を用い、1 0 0  $\mu$  lの反応混合液に1  $\mu$  MのF R-シャッフリングプライマーF 3 M M SとF 3 M M A、又はF 3 B M SとF 3 B M Aをそれぞれ5  $\mu$  lずつ、0. 2 mMのd N T P s、1. 5 mMのM g C l<sub>2</sub>、2. 5 UのAmpli Taq Goldを含む条件で添付緩衝液を使用して9 4 °Cにて3 0秒間、5 0 °Cにて1分間、7 4 °Cにて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに1 0 0 p m o l eの外部プライマーF 3 P r S及びF 3 P r Aを加え、同じ温度サイクルを2 5回行った。

P C R法により増幅したDNA断片を2 %のNu Sieve GTGアガロース (FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。4 2 4 b p長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、3倍量 (m l / g)のT Eを添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出によりDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、その3分の1量を水1 4  $\mu$  lに溶解した。得られたP C R反応混合物をB a

I I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C ( B a l I / N c o I ) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v i / C V I D E C 及び h A T R 5 H v j / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “ i ” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “ i ” アミノ酸配列を配列番号 6 9 及び 7 0 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v j / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “ j ” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “ j ” のアミノ酸配列を配列番号 7 1 及び 7 2 に示す。

( v i i ) ヒト型化 H 鎖バージョン “ b 1 ” 及び “ d 1 ” の構築  
バージョン “ b 1 ” 及び “ d 1 ” は F R - シャッフリング法によってバージョン “ b ” 及び “ d ” の F R 2 を別のヒト抗体由来の F R 2 に置換し作製した。ヒト抗体 P01742 ( SWISS-PROT、Cunningham BA. ら、Biochemistry, 9, 3161-3170, 1970 ) 由来のものに置換するため、F R 2 をコードする D N A プライマーを 2 個作製した。F R - シャッフリングベクター F 2 M P S ( 配列番号 7 3 ) はセンス D N A 配列を有し、F 2 M P A ( 配列番号 7 4 ) はアンチセンス D N A 配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端には E c o T 2 2 I 及び B a l I の認識配列を有する。

F 2 M P S、F 2 M P A は Pharmacia Biotech により合成及び精製された。F 2 M P S と F 2 M P A をアニールさせ、E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化した。これを E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C ( E c o T 2 2 I / B a l I ) 及び h A T R 5 H v d / C V I D E C ( E c o T 2 2 I / B a l I ) に導入し、塩基配列を決定

した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 1 / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v b 1 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “b 1” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “b 1” アミノ酸配列を配列番号 7 5 及び 7 6 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v d 1 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “d 1” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “d 1” のアミノ酸配列を配列番号 7 7 及び 7 8 に示す。

(v i i i) ヒト型化 H 鎖バージョン “b 3” 及び “d 3” の構築

バージョン “b 3” 及び “d 3” は F R - シャッフリング法によってバージョン “b” 及び “d” の F R 2 を別のヒト抗体由来の F R 2 に置換し作製した。ヒト抗体 Z80844 (DDBJ、Thomsett AR. ら, unpublished) 由来の F R 2 に置換するため、F R 2 をコードする D N A プライマーを 2 個作製した。F R - シャッフリングベクター F 2 V H S (配列番号 7 9) はセンス D N A 配列を有し、F 2 V H A (配列番号 8 0) はアンチセンス D N A 配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端には E c o T 2 2 I 及び B a l I の認識配列を有する。F 2 V H S、F 2 V H A は Pharmacia Biotech に合成、精製を委託した。

F 2 V H S と F 2 V H A をアニールさせ、E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化した。これを E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a l I) 及び h A T R 5 H v d / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a l I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C

及び h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “b 3” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “b 3” アミノ酸配列を配列番号 8 1 及び 8 2 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “d 3” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “d 3” のアミノ酸配列を配列番号 8 3 及び 8 4 に示す。

## (2) ヒト型化抗体 L 鎖 V 領域の構築

### (i) バージョン “a”

ヒト型化 A T R 5 抗体 L 鎖を、P C R 法による C D R - グラフティングにより作製した。ヒト抗体 Z37332 (DDBJ、Welschof Mら, J. Immunol. Methods, 179, 203-214, 1995) 由来のフレームワーク領域を有するヒト型化抗体 L 鎖 (バージョン “a”) の作製のために 7 本の P C R プライマーを使用した。

C D R - グラフティングプライマー h 5 L v 1 S (配列番号 8 5) 及び h 5 L v 4 S (配列番号 8 6) はセンス D N A 配列を、C D R グラフティングプライマー h 5 L v 2 A (配列番号 8 7)、h 5 L v 3 A (配列番号 8 8) 及び h 5 L v 5 A (配列番号 8 9) はアンチセンス D N A 配列を有し、各プライマーの両端に 2 0 b p の相補的配列を有する。外部プライマー h 5 L v S (配列番号 9 0) 及び h 5 L v A (配列番号 9 1) は C D R グラフティングプライマー h 5 L v 1 S 及び h 5 L v 5 A とホモロジーを有する。C D R - グラフティングプライマー h 5 L v 1 S、h 5 L v 4 S、h 5 L v 2 A、h 5 L v 3 A、h 5 L v 5 A、h 5 L v S 及び h 5 L v A は P harmacia Biotech に合成、精製を委託した。

P C R 溶液は、1 0 0  $\mu$  l 中に 1 2 0 m M T r i s - H C l (

pH 8.0)、10 mM KCl、6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、2.5 ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、5 pmoleのCDRグラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv4S、及びh5Lv5Aを含有する。

PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94℃にて30秒間、50℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフティングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100 pmoleの外部プライマーh5LvS及びh5LvAを加え、94℃にて30秒間、52℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを30回行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

PCR反応混合液を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素SplI(宝酒造)及びBglII(宝酒造)により37℃で4時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 10  $\mu$ lに溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むSplI-BglII DNA断片とSplI及びBglIIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞（ニッポンジーン）100  $\mu$  l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300  $\mu$  l のHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100  $\mu$  g / m l L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A 培地3 m l で37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造)及びM13 Primer RV (宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'側にはBglII認識配列及びKozak配列、3'側にはSplI認識配列を持つプラスミドをhATR5Lv a / CVIDECと命名した。ヒト型化L鎖バージョン“a”の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）を配列番号92に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号93に示す。

(ii) バージョン“b”及び“c”

バージョン“b”及び“c”を、バージョン“a”のFR3を置換（FR-シャッフリング）することにより作製した。バージョン“b”にはヒト抗体S68699 (DDBJ、Hougs L ら, Exp.Clin.Immunogen et., 10, 141-151, 1993)由来のFR3を、バージョン“c”にはヒト抗体P01607 (SWISS-PROT、Epp O ら, Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975)由来のFR3をそれぞれ使用した。

バージョン“b”のFR3をコードするプライマーF3SS（配列番号94）とF3SA（配列番号95）、あるいはバージョン“c”のFR3をコードするプライマーF3RS（配列番号96）とF3RA（配列番号97）は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素KpnI及びPstIの認識配列を有する。F3SS、F3SA、F3RS、F3RAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。各100 pmoleのF3SSとF3SA、あるいはF3RSとF3RAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lva/CVIDECを制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース（FMC BioProducts）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

上記のようにして調製したバージョン“b”あるいは“c”のFR3をコードするKpnI-PstI DNA断片とKpnI及びPstIで消化することによりFR3を除去したhATR5Lva/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結



した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞（ニッポンジーン）100  $\mu$  l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300  $\mu$  l のHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100  $\mu$  g / m l L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A 培地3 m l で37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“a”のFR3を置換したバージョン“b”あるいはバージョン“c”をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれh A T R 5 L v b / C V I D E C、h A T R 5 L v c / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 L v b / C V I D E Cに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b”アミノ酸配列を配列番号98、99に示す。また、プラスミドh A T R 5 L v c / C V I D E Cに含まれるヒト型化L鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号100および101に示す。

（i i i）バージョン“b1”及び“b2”

バージョン“b1”及び“b2”を、バージョン“b”のFR2

を置換することにより作製した。バージョン“b 1”にはヒト抗体 S65921 (DDBJ、Tonge DWら, Year Immunol., 7, 56-62, 1993)由来の F R 2 を、バージョン“b 2”にはヒト抗体 X93625 (DDBJ、Cox JPら, Eur. J. Immunol., 24, 827-836, 1994)由来の F R 2 をそれぞれ使用した。

バージョン“b 1”の F R 2 をコードするプライマー F 2 S S (配列番号 1 0 2) と F 2 S A (配列番号 1 0 3)、あるいはバージョン“b 2”の F R 2 をコードするプライマー F 2 X S (配列番号 1 0 4) と F 2 X A (配列番号 1 0 5) は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素 A f l I I 及び S p e I の認識配列を有する。F 2 S S、F 2 S A、F 2 X S 及び F 2 X A は Pharmacia Biotech により合成された。各 1 0 0 p m o l e の F 2 S S と F 2 S A、あるいは F 2 X S と F 2 X A を 9 6 °C にて 2 分間、5 0 °C にて 2 分間処理することによりアニーリングさせ、2 本鎖 D N A 断片を作製した。

これら 2 本鎖 D N A 断片を制限酵素 A f l I I (宝酒造) 及び S p e I (宝酒造) により 3 7 °C で 1 時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E に溶解した。

プラスミド h A T R 5 L v b / C V I D E C を制限酵素 A f l I I (宝酒造) 及び S p e I (宝酒造) により 3 7 °C で 1 時間消化した。消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 3 0 0 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E に溶解した。

上記のようにして調製したバージョン“b 1”あるいは“b 2”

のFR2をコードするA f l l l - S p e I DNA断片とA f l l l 及びS p e Iで消化することによりFR2を除去したh A T R 5 L v b / C V I D E CベクターをDNAライゲーションキットv e r . 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン)100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml L B A寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A培地4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“b”のFR2を置換したバージョン“b1”あるいはバージョン“b2”をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれh A T R 5 L v b 1 / C V I D E C及びh A T R 5 L v b 2 / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 L v b 1 / C V I D E Cに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号106及び107に示す。また、プラスミドh A T R 5 L v b 2 / C V I D E Cに含まれるヒト型化

L鎖バージョン“b2”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b2”のアミノ酸配列を配列番号108及び109に示す。

(3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築

(i) ヒト型化H鎖とキメラL鎖との組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hva/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHva-chLv/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvb-chLv/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvc/CVIDEC、hATR5Hvd/CVIDEC及びhATR5Hve/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvc-chLv/N5KG4P、hHvd-chLv/N5KG4P及びhH

v e - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v f / C V I D E C 及びh A T R 5 H v h / C V I D E C をN h e I 及びS a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P をN h e I 及びS a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P ( S a l I / N h e I ) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v f - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v h - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v i / C V I D E C 及びh A T R 5 H v j / C V I D E C をN h e I 及びS a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P をN h e I 及びS a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P ( S a l I / N h e I ) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v i - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v j - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及びh A T R 5 H v d 1 / C V I D E C をN h e I 及びS a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P をN h e I 及びS a l I にて消化することにより調製したc h A T R 5 / N 5 K G 4 P ( S a l I / N h e I ) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v b 1 - c h L v / N 5 K G 4 P 及びh H v d 1 - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

( i i ) ヒト型化L鎖とキメラH鎖との組み合わせ

抗体発現ベクターN 5 K G 4 P を用いて、キメラH鎖との組み合

わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価を行った。

プラスミド h A T R 5 L v a / C V I D E C、h A T R 5 L v b / C V I D E C、h A T R 5 L v c / C V I D E C、h A T R 5 L v b 1 / C V I D E C、h A T R 5 L v b 2 / C V I D E C を制限酵素 B g 1 I I (宝酒造) 及び S p 1 I (宝酒造) により 37℃で2～3時間消化した。消化混合物を1.5%または2% NuSieve G TGアガロース(FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含む S p 1 I - B g 1 I I DNA断片と S p 1 I 及び B g 1 I I で消化した c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P を DNAライゲーションキット v e r. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体をL B A 培地 250mlまたは500mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からPlasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれ c h H v - h L v a / N 5 K G 4 P、c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P、c

hHv-hLv c / N5KG4P、chHv-hLv b1 / N5KG4P及びchHv-hLv b2 / N5KG4Pと命名した。

(iii) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a / CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a / N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv a / N5KG4P (SalI / NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv a-hLv a / N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b / CVIDEC及びhATR5Hv c / CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“a”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv a / N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv a / N5KG4P (SalI / NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv a / N5KG4P及びhHv c-hLv a / N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b / CVIDEC、hATR5Hv d / CVIDEC及びhATR5Hv e / CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv-hLv b / N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLv b / N5KG4P (SalI / NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv b-hLv b / N5KG4P、hHv d

—hLvb/N5KG4P及びhHve—hLvb/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvf/CVIDEC、hATR5Hvg/CVIDEC及びhATR5Hvh/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv—hLvb/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvb/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvf—hLvb/N5KG4P、hHvg—hLvb/N5KG4P及びhHvh—hLvb/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvi/CVIDEC及びhATR5Hvj/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv—hLvb/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvb/N5KG4P(SalI/NheI)に導入した。こうして作製したプラスミドをhHvi—hLvb/N5KG4P及びhHvj—hLvb/N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、ヒト型化ATR-5抗体L鎖バージョン“b”cDNAの配列を含むプラスミドchHv—hLvb/N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したhLvb/N5KG4P(SalI/



Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b 1 - hLv b / N5KG4P 及び hHv d 1 - hLv b / N5KG4P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド hATR5Hv b 3 / CVIDEC 及び hATR5Hv d 3 / CVIDEC を Nhe I 及び Sal I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 ATR-5 抗体 L鎖バージョン “b” cDNA の配列を含むプラスミド chHv - hLv b / N5KG4P を Nhe I 及び Sal I にて消化することにより調製した hLv b / N5KG4P (Sal I / Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b 3 - hLv b / N5KG4P 及び hHv d 3 - hLv b / N5KG4P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド hATR5Hv b / CVIDEC を Nhe I 及び Sal I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 ATR-5 抗体 L鎖バージョン “b 1” 及び “b 2” cDNA の配列を含むプラスミド chHv - hLv b 1 / N5KG4P 及び chHv - hLv b 2 / N5KG4P を Nhe I 及び Sal I にて消化することにより調製した hLv b 1 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) 及び hLv b 2 / N5KG4P (Sal I / Nhe I) に導入した。こうして作製したプラスミドを hHv b - hLv b 1 / N5KG4P 及び hHv b - hLv b 2 / N5KG4P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド hATR5Hv i / CVIDEC を Nhe I 及び Sal I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 ATR-5 抗体 L鎖バージョン “b 1” 及び “b 2” cDNA の配列を含むプラスミド chHv - hLv b 1 / N5KG4P 及び chHv - hLv b 2 / N5KG4P を Nhe I

及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b 1 / N 5 K G 4 P ( S a l I / N h e I ) 及び h L v b 2 / N 5 K G 4 P ( S a l I / N h e I ) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び h H v i - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

#### (4) C O S - 7 細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを C O S - 7 細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターを G e n e P u l s e r 装置 ( B i o - R a d ) を用いてエレクトロポレーションにより C O S - 7 細胞に形質導入した。P B S 中に  $1 \times 10^7$  細胞 / m l の細胞濃度で懸濁されている C O S - 7 細胞 0.78 m l に、プラスミド  $50 \mu g$  あるいは  $20 \mu g$  を加え、1,500 V,  $25 \mu F$  の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を5%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有する D M E M 培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿あるいは15cm培養皿を用いてC O<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地 H B C H O (アーバインサイエンティフィック)を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

#### (5) 抗体の精製

C O S - 7 細胞の培養上清からの抗体の精製を AffiGel Protein A MAPSII キット (Bio-Rad)、あるいは rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) を用いて行った。AffiGel Protein A MAPSII キットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rPro

tein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

1 ml の rProtein A Sepharose Fast Flow をカラムに充填し、10 倍量の TBS を流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムに COS-7 細胞の培養上清をアプライした後、10 倍量の TBS によってカラムを洗浄した。次に 13.5 ml の 2.5 mM HCl (pH 3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5 ml の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ 30 もしくは 100 (amicon) を用いた限外濾過を 2~3 回行うことにより、TBS に溶媒を置換し、最終的に約 1.5 ml まで濃縮した。

#### 実施例 4. 抗体の定量及び活性評価

##### (1) ELISA による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のための ELISA プレートを次のようにして調製した。ELISA 用 96 穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.02% NaN<sub>3</sub>、pH 9.6) (以下、CB と称す) で 1 µg/ml の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) 100 µl で固相化し、200 µl の希釈バッファー (50 mM Tris-HCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1M NaCl、0.05% Tween 20、0.02% NaN<sub>3</sub>、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、pH 8.1) (以下 DB と称す) でブロッキングの後、抗体を発現させた COS-7 細胞の培養上清あるいは精製抗体を DB にて段階希釈して各穴に加えた。

1 時間室温にてインキュベートし 0.05% Tween 20 を含むダルベッコ PBS (以下 RB と称す) で洗浄後、DB で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG γ 抗

体(BioSource) 100  $\mu$ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、1mg/mlとなるようにSigma 104 (p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を基質バッファー(50mM NaHCO<sub>3</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>、pH9.8)に溶解したもの(以下、基質溶液と称す)を加え、405/655nmでの吸光度をmicroplate reader (Bio Rad)で測定した。濃度測定のスランダーとしてIgG4 $\kappa$  (The Binding Site)を用いた。

### (2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に1 $\times$ 10<sup>6</sup>個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO<sub>2</sub>インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、300  $\mu$ lのPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に100  $\mu$ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

PFA/PBSを捨て、300  $\mu$ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250  $\mu$ lのDBでブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して100  $\mu$ lを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG $\gamma$ 抗体(BioSource) 100  $\mu$ lを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad)で測定した。

### (3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎

盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) による Factor Xa 産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、1.25 mg/ml の Thromborel S 10  $\mu$ l と適当な濃度に希釈した抗体 10  $\mu$ l に緩衝液 (5 mM の  $\text{CaCl}_2$ 、0.1% の BSA を含む TBS) 60  $\mu$ l を加え、96 穴プレート中で室温で 1 時間反応させた。これに 3.245  $\mu$ g/ml のヒトファクター X (セルサス・ラボラトリーズ) 及び 82.5 ng/ml のヒトファクター V I I a (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ 10  $\mu$ l 加え、さらに室温で 1 時間反応させた。

0.5 M の EDTA を 10  $\mu$ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50  $\mu$ l 加え、Microplate Reader(Bio Rad)で 405 / 655 nm の吸光度を測定した。室温で 1 時間反応させ、再度 405 / 655 nm の吸光度を測定した。抗体無添加の 1 時間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenic) を添付文書に従い溶解し、精製水で 2 倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1:1 で混和し調製した。

#### (4) 活性の評価

##### (i) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖を組み合わせた抗体 (a-ch) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた (図 1)。FXa 産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体 (ch-ch) に比べて弱い活性であった (図 2)。よってヒト型化 H 鎖は FR-シャッフリングによるバージョンアップを行う

ことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はC O S - 7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

( i i ) ヒト型化 L 鎖バージョン “ a ” とキメラ H 鎖との組合せ

ヒト型化 L 鎖バージョン “ a ” とキメラ H 鎖を組み合わせた抗体 ( c h - a ) を作製し、 c e l l E L I S A にて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた ( 図 1 ) 。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性であった ( 図 2 ) 。よってヒト型化 L 鎖も F R - シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は C O S - 7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

( i i i ) ヒト型化 H 鎖バージョン “ a ” とヒト型化 L 鎖バージョン “ a ” との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “ a ” とヒト型化 L 鎖バージョン “ a ” を組み合わせた抗体 ( a - a ) を作製し、 c e l l E L I S A にて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた ( 図 3 ) 。 F X a 産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった ( 図 4 ) 。よってヒト型化 H 鎖及び L 鎖の F R - シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は C O S - 7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

( i v ) ヒト型化 H 鎖バージョン “ b ” 、 “ c ” 及び “ d ” とキメラ L 鎖との組合せ

F R - シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化 H 鎖とキメラ L 鎖を組み合わせた抗体 ( それぞれ “ b - c h ” 、 “ c - c h ” 、 及び “ d - c h ” ) を作製し、 c e l l E L I S A にて抗原結合能を調べたところ、 “ d - c h ” はキメラ抗体と同等の

抗原結合活性が認められ、“b-c h”及び“c-c h”はわずかに劣る抗原結合活性を示した（図5，6）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-c h”はほぼ同等、“d-c h”はわずかに弱い活性であった。またバージョン“c-c h”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図7）。よってヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

（v）ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体（b-a）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する結合量が低下していた（図5）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった（図8）。よって“b-a”が“a-a”より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

（vi）ヒト型化L鎖バージョン“b”、“c”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h-b”、“c h-c”）を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した（図9及び10）。よってバージョン“b”及び“c”をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン“b”の方がバージョン“c”より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いた

キメラ抗体はCHO細胞DG44で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。

(vii) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”と組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“b-c”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した（図11及び12）。

(viii) ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とヒト型化L鎖バージョン“b”を組み合わせた抗体（それぞれ“b-b”及び“d-b”）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d-b”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-b”は高濃度でわずかに劣る抗原結合活性を示した（図13）。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-b”はわずかに弱い活性で、“d-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図14）。よって“b-b”は抗原活性中和能の高いバージョン、“d-b”は抗原結合能の高いバージョンであることが示された。

(ix) ヒト型化H鎖バージョン“e”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“e”をキメラL鎖及びヒト型化バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“e-ch”及び“e-b”）を作製したところ、“e-ch”の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、“e-b”は抗体の発現量が非常に低く



、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた（図 1 5）。また“e-c h”の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図 1 6）。よってH鎖バージョン“e”はL鎖バージョン“b”との組合せが悪いと考えられた。

（x）ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“f-b”、“g-b”及び“h-b”）作製したところ、“f-b”及び“h-b”の抗体は抗体の発現量が非常に低くかった。なお、バージョン“f”、“h”についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。“g-b”は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した（図 1 7）。“g-b”の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図 1 8）。

（x i）ヒト型化H鎖バージョン“b 1”及び“d 1”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b 1”及び“d 1”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“b 1-b”及び“d 1-b”）作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

（x i i）ヒト型化H鎖バージョン“b 3”及び“d 3”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b 3”及び“d 3”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“b 3-b”及び“d 3-b”）作製したところ、“d 3-b”の抗原結合能はキメ

ラ抗体よりわずかに劣っており、“b 3 - b”の抗原結合能はさらに劣っていた（図 1 9）。“b 3 - b”の抗原中和能は“b - b”より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、“d 3 - b”は“b - b”と同程度の活性にとどまった（図 2 0）。  
（x i i i）ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”及び“j”をキメラL鎖と組み合わせた抗体（それぞれ“i - c h”及び“j - c h”）とヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“i - b”及び“j - b”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した（図 2 1、2 2）。“i - c h”にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、“j - c h”の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図 2 3）。“i - b”はキメラ抗体と同等の活性が認められ、“j - b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった（図 2 4）。

（x i v）ヒト型化L鎖バージョン“b 1”及び“b 2”

ヒト型化L鎖バージョン“b 1”及び“b 2”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h - b 1”及び“c h - b 2”）を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した（図 2 5）。抗原中和能については、“c h - b 1”ではキメラ抗体と同等の活性を示し、“c h - b 2”では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた（図 2 6）。バージョン“b 1”及び“b 2”ともにヒト型化抗体L鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン“b 2”の方が優れている。

（x v）ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン

### “b 2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b 2”と組み合わせた抗体（“b-b 2”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた（図27）。抗原中和能は“b-b”の活性を上回ったものの、“i-b”の活性には及ばなかった（図28）。

（x v i）ヒト型化H鎖バージョン“i”とヒト型化L鎖バージョン“b 1”又は“b 2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”をヒト型化L鎖バージョン“b 1”又は“b 2”と組み合わせた抗体（それぞれ“i-b 1”及び“i-b 2”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。“i-b 2”の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、“i-b 1”はわずかに劣る程度であった（図29）。また、“i-b 1”及び“i-b 2”の抗原中和能はキメラ抗体や“i-b”を上回る活性を示し、“i-b 2” > “i-b 1”の順に強かった（図30）。

### 実施例 5. CHO細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価

#### （1）CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体（b-b、i-b及びi-b 2）の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したCHO細胞（DG44）に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

プラスミドDNA、hHv b-hLv b/N5KG4P、hHv i-hLv b/N5KG4P及びhHv i-hLv b 2/N5KG4Pを制限酵素Ssp I（宝酒造）で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポレーション装置（Gene Pulser；Bio Rad）により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに $1 \times 10^7$  / mlの細

胞密度で懸濁し、この懸濁液約 0.8 ml に前記の DNA を 10 もしくは 50  $\mu$ g を加え、1,500 V, 25  $\mu$ F の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、ヒポキサンチン-チミジン (GIBCO) (以下、HT) を含有する CHO-S-SFMII 培地に処理された細胞を懸濁し、2 枚の 96 穴平底プレート (Falcon) に 100  $\mu$ l / 穴となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。培養開始 8 ~ 9 時間後に HT 及び 1 mg / ml の GENETICIN (GIBCO) を含有する CHO-S-SFMII 培地を 100  $\mu$ l / 穴加え、500  $\mu$ g / ml の GENETICIN 選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3 ~ 4 日に一度 1 / 2 量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約 2 週間経過した時点で、その 4 ~ 5 日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定 ELISA により測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

## (2) ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体 (“b-b”、“i-b”及び “i-b2”) 発現 DG44 細胞株を 2 L ローターボトル (CONING) を用い、500 ml / ボトルの CHO-S-SFMII 培地中で数日培養後、培養液を回収して新鮮な CHO-S-SFMII 培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、0.22  $\mu$ m もしくは 0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約 2 L の培養上清を得た。得られた培養上清を Protein A アフィニティークラム (Poros) を接続した ConSep LC100 システム (ミリポア) にて抗体を精製した。

## (3) ELISA による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのE L I S Aプレートを次のようにして調製した。E L I S A用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴をC Bで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトI g G  $\gamma$ 抗体(BioSource)  $100\mu\text{l}$ で固相化し、 $200\mu\text{l}$ のD Bでブロッキングの後、抗体を発現させたC O S細胞の培養上清あるいは精製抗体をD Bにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートしR Bで洗浄後、D Bで $1000$ 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトI g G  $\gamma$ 抗体(BioSource)  $100\mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしR Bで洗浄の後、基質溶液を $100\mu\text{l}$ 加え、 $405/655\text{nm}$ での吸光度をmicroplate reader(B i o R a d)で測定した。濃度測定のスタンダードとしてI g G  $4\kappa$ (The Binding Site)を用いた。

#### (4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのC e l l E L I S Aプレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J 8 2 (A T C C H T B - 1)を用いた。細胞培養用96穴プレートに $1 \times 10^6$ 個のJ 8 2細胞を播き込んだ。これをC O 2インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(G I B C O)を含むR P M I 1 6 4 0培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、P B Sで各穴を2回洗浄した。P F A / P B Sを各穴に $100\mu\text{l}$ 加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

P F A / P B Sを捨て、 $300\mu\text{l}$ のP B Sで各穴を2回洗浄後、 $250\mu\text{l}$ のD Bでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、D Bにて $10\mu\text{g}/\text{ml}$ より公比2で段階希釈して $100\mu\text{l}$ を各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしR Bで洗浄後、D Bで $1000$ 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤ

ギ抗ヒト IgG  $\gamma$  抗体 (BioSource) 100  $\mu$ l を加えた。室温にて 1 時間インキュベートし RB で洗浄ののち、基質溶液を 100  $\mu$ l 加え、次に 405 / 655 nm での吸光度を Microplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(5) TF 中和活性 (ファクター Xa 産生阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のファクター Xa 産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) による Factor Xa 産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5 mg / ml の Thromborel S 10  $\mu$ l と抗体 10  $\mu$ l に緩衝液 (5 mM の CaCl<sub>2</sub>、0.1 % の BSA を含む TBS) 60  $\mu$ l を加え、96 穴プレート中で室温で 1 時間反応させた。抗体は緩衝液で 200  $\mu$ g / ml より公比 5 で段階希釈した。

これに 3.245  $\mu$ g / ml のヒトファクター X (セルサス・ラボラトリーズ) 及び 82.5 ng / ml のヒトファクター VIIa (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ 10  $\mu$ l 加え、さらに室温で 45 分間反応させた。0.5 M の EDTA を 10  $\mu$ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50  $\mu$ l 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で 405 / 655 nm の吸光度を測定した。室温で 30 分間反応させ、再度 405 / 655 nm の吸光度を測定した。抗体無添加の 30 分間の吸光度変化を 100 % の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 mg / ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1 : 1 で混和し調製した。

(6) TF 中和活性 (ファクター X 結合阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のファクター X 結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロ

ンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) を用い、予め T F と F a c t o r V I I a の複合体を形成させ、その複合体の F a c t o r X a 産生阻害活性を指標にファクター X 結合阻害活性を測定した。すなわち、5 m g / m l の Thromborel S 10  $\mu$  l と 82.5 n g / m l のヒト F a c t o r V I I a (エンザイム・リサーチ) 10  $\mu$  l に緩衝液 (5 m M の C a C l 2、0.1 % の B S A を含む T B S) 60  $\mu$  l を加え、96 穴プレート中で室温で予め 1 時間反応させた。

これに抗体溶液を 10  $\mu$  l 加え、室温で 5 分間反応させた後、3.245  $\mu$  g / m l のヒト F a c t o r X (セルサス・ラボラトリーズ) を 10  $\mu$  l 加え、さらに室温で 45 分間反応させた。なお抗体は緩衝液で 200  $\mu$  g / m l より公比 2 で段階希釈した。0.5 M の E D T A を 10  $\mu$  l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 50  $\mu$  l 加え、M i c r o p l a t e R e a d e r (B i o R a d) で 405 / 655 n m の吸光度を測定した。室温で 30 分間反応させ、再度 405 / 655 n m の吸光度を測定した。抗体無添加の 30 分間の吸光度変化を 100 % の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S - 2 2 2 2 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0.6 m g / m l ヘキサジメチリンブロマイド、S I G M A) と 1 : 1 で混和し調製した。

#### (7) T F 中和活性 (血漿凝固阻害活性) の測定

ヒト型化抗体の T F 中和活性 (血漿凝固阻害活性) はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG) を用いたプロトロンビン時間を指標に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿 (コスモ・バイオ) 100  $\mu$  l を入れ、これに様々な濃

度に希釈した抗体を  $50 \mu\text{l}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で3分間加温した。予め  $37^\circ\text{C}$  に加温しておいた  $1.25 \text{ mg/ml}$  のThromborel Sを  $50 \mu\text{l}$  加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間はAmelung CR-Aを接続したAmelung KC-10A（ともにエム・シー・メディカル）にて測定した。

抗体は  $80 \mu\text{g/ml}$  より公比2で0.1%のBSAを含有するTBS（以下、BSA-TBS）にて段階希釈した。測定した抗体無添加の凝固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその凝固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、 $50 \mu\text{l}$  に  $50 \mu\text{l}$  のBSA-TBSを加え、 $37^\circ\text{C}$  で3分間加温し、予め  $37^\circ\text{C}$  に加温しておいたヒト血漿を  $100 \mu\text{l}$  加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは  $6.25 \text{ mg/ml}$  より公比2で  $25 \text{ mM}$  の  $\text{CaCl}_2$  を含むハックス緩衝液（GIBCO）にて段階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

#### （8）活性の評価

“b-b”、“i-b”及び“i-b2”のヒト型化抗体すべてはキメラ抗体と同等以上の活性を有していた（図31）。Factor Xa産生阻害活性、Factor X結合阻害活性及び血漿凝固阻害活性においても、ヒト型化抗体“b-b”、“i-b”及び“i-b2”はキメラ抗体と同等以上の活性を有しており、“i-b2” > “i-b” > “b-b”の順に活性が強かった（図32、33及び34）。

#### 実施例6. B I A C O R Eを用いたTFと抗TF抗体の相互作用



における反応速度論的解析

BIACOREを用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。組換え型Protein Gをセンサーチップに固相化し、これに抗体を結合させた。抗原として精製した組換え型TF（1-219にFLAGペプチドタグを付した可溶型TF）（以下、可溶型TFと称す）を用い、種々の濃度に調製した可溶型TFをアナライトとした。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター（解離速度定数 $k_{dis}$ 及び結合速度定数 $k_{as}$ ）を算出した。速度論的解析に関して、「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(karlsson, R. et al. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240.)を参考にした。

(1) センサーチップへの Protein Gの固相化

センサーチップCM5 (BIACORE) へProtein G (ZYMED) を固相化する。

ランニングバッファーとしてHBS-EP 緩衝液 (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% ポリソルベート 20 (v/v)) (BIACORE) を用い、流速は5  $\mu$ L/分とした。センサーチップCM5 上のカルボキシメチルデキストランのカルボキシル基を100  $\mu$ L の0.05M N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) / 0.2M 塩酸N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) のインジェクトにより活性化した。引き続き、10  $\mu$ L の50  $\mu$ g/mL Protein Gをインジェクトし、これを3回行って固相化した。Protein Gは10 mg/mLになるように10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) にて50  $\mu$ g/mLに希釈し

調製した。さらに  $100\ \mu\text{L}$  の  $1.0\ \text{M}$  エタノールアミン塩酸 ( $\text{pH } 8.5$ ) をインジェクトし、過剰の活性基をブロックした。これに  $10\ \mu\text{L}$  の  $0.1\ \text{M}$  グリシン塩酸緩衝液 ( $\text{pH } 2.5$ ) および  $10\ \mu\text{L}$  の  $10\ \text{mM}$  塩酸をインジェクトし、非共有結合している物質を洗浄した。これを各フローセルについて行い、 $72\ \text{nM}$  のヒト型化抗TF抗体バージョン“ib2”を  $10\ \mu\text{L}$  インジェクトし、約  $1000\ \text{RU}$  結合することを確認した。

## (2) 固相化抗TF抗体とヒトTFとの相互作用

ヒトTFは、アミノ酸配列1-219のC末端にFLAGペプチドを連結させたものをCHO細胞にて発現させて精製した。これを可溶型ヒトTFとして用いた。

ランニングバッファーとしてHBS-EP緩衝液を用い、流速  $20\ \mu\text{L}/\text{分}$  で  $72\ \text{nM}$  の抗体溶液を  $10\ \mu\text{L}$  インジェクトし、抗体を固相化した。抗体の希釈はHBS-EP緩衝液を用いて行った。これに各種濃度の可溶型ヒトTF溶液  $40\ \mu\text{L}$  を流速  $30\ \mu\text{L}/\text{分}$  でインジェクトし、分析はインジェクトする80秒を結合相とし、その後HBS-EP緩衝液に切り替え、120秒の解離相とした。解離相終了後、 $10\ \mu\text{L}$  の  $20\ \text{mM}$  塩酸をインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の1サイクルとし、各種抗体についてセンサーグラムを得た。なお、可溶型ヒトTF溶液はHBS-EP緩衝液を用い、 $250\ \text{nM}$ 、 $125\ \text{nM}$ 、 $62.5\ \text{nM}$ 、 $31.3\ \text{nM}$ 、 $15.6\ \text{nM}$ 、 $7.81\ \text{nM}$ 、 $3.91\ \text{nM}$  の濃度に調製した。また、ブランクには希釈に用いたHBS-EP緩衝液をインジェクトして得られたセンサーグラムを用いた。

以上のことをフローセルの1～3それぞれで行った。

## (3) 相互作用の速度論的解析

目的のデータファイルを読み込み、目的の反応領域について、HBS-E P 緩衝液のセンサーグラムをベースラインとして、重ね書きによる反応パターンの比較を行った。さらにカーブフィッティングによるカインेटィクスパラメーター（結合速度定数  $k_{ass}$  及び解離速度定数  $k_{diss}$ ）の算定を行う BIACORE専用の解析アプリケーションソフトウェアである「BIAevaluation 2.1」（Pharmacia）を用いて、相互作用の速度論的解析を行った。なお、結合速度定数  $k_{ass}$  を求める際には、解析モデルタイプ 4 を用いた（BIAevaluation 2.1 Software Hand book, A1～A5）。それぞれのフローセルから算出した値から、各種抗体のカインेटィクスパラメーターを得た。結果（各フローセルから算出した値の平均値±標準偏差）を表 6 に示す。

表 6

キメラ及びヒト型化抗TF抗体のカインेटィクスパラメーター（ $n = 3$ ）

	キメラ	b-b	i-b	i-b2
$k_{diss}$ [ $\times 10^{-4}$ 1/s]	$5.06 \pm 0.12$	$9.52 \pm 0.22$	$6.49 \pm 0.17$	$6.35 \pm 0.15$
$k_{ass}$ [ $\times 10^5$ 1/Ms]	$4.65 \pm 0.32$	$4.15 \pm 0.27$	$4.67 \pm 0.30$	$5.44 \pm 0.36$
KD [ $\times 10^{-9}$ M]	$1.09 \pm 0.09$	$2.30 \pm 0.15$	$1.39 \pm 0.13$	$1.17 \pm 0.11$

#### 実施例 7. ヒト型化抗TF抗体のヒトTFへの反応性の測定

ドットプロットハイブリダイゼーション法（「改訂版分子生物学研究のためのタンパク実験法」（羊土社）竹縄忠臣／編 p.101）によって、非変性TF、非還元下変性TF、還元下変性TFへの反応性を検討した。TFは細胞外領域にFLAGタグを付したものをCHO細胞にて発現させ、精製したもの（shTF）を用いた。shTFをそれぞれ次の3種の緩衝液（緩衝液A：10mM Tris

s-HCl, pH 8.0; 緩衝液 B: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 M 尿素; 緩衝液 C: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 M 尿素, 5 mM DTT) にて希釈した。緩衝液 A で処理したものは非変性 TF であり、一方、非還元下変性 TF は緩衝液 B で処理し、還元下変性 TF は緩衝液 C で処理して調製した。それぞれのサンプルは室温で 24 時間処理した。処理後、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) にサンプルをブロッティングした。サンプルを 0.5  $\mu$ l、1  $\mu$ l 及び 2  $\mu$ l (3  $\mu$ g/ml) 膜にプロットし、膜を風乾した。DB (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 0.15 M NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, 1% (w/v) BSA) でブロッキングした。膜をヒト型化抗 TF 抗体を含む DB もしくは DB (コントロール) で反応させた。0.05% (v/v) Tween 20 を含む PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (DAKO) を含む DB で反応させた。0.05% (v/v) Tween 20 を含む PBS で洗浄した後、ECL Western Blotting reagent (Amersham) で処理し、X 線フィルムに 30 秒間暴露させた。

図 35 に示したようにキメラ型抗 TF 抗体及びヒト型化抗 TF 抗体 (バージョン "bb" "ib" 及び "ib2") は非変性 TF、非還元下変性 TF、還元下変性 TF 全てに反応した。

#### 実施例 8. ラット急性 DIC モデルにおける抗血栓作用の確認

抗 TF 抗体の抗血栓作用について、ラットを用いたトロンボプラスチン誘発 DIC モデルで確認した。すなわち、SD 系雄性ラットにヒトトロンボプラスチン溶液を 40mg/kg の用量で 3 時間かけて静脈内に持続注入することで DIC モデルを作製した。抗 TF 抗体 (キメラおよ

びヒト型化抗TF抗体 i - b 2 ) は各々 0.2mg/kg の用量でトロンボプラスチン溶液の注入開始 5 分前に静脈内投与した。トロンボプラスチン溶液の持続注入終了 15 分後に腹部大動脈からクエン酸加血液を採取し、血小板数、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)、フィブリノーゲン濃度(Fib)、可溶性フィブリンモノマー複合体(sFMC)濃度、トロンビン/ アンチトロンビンIII 複合体(TAT) 濃度を測定した。

その結果、表 7 に示すように、トロンボプラスチンの持続注入により血小板数の減少、aPTT の延長、フィブリノーゲン濃度の減少、sFMC および TAT 濃度の上昇が認められ、明らかな凝固亢進状態を呈した。これに対し、キメラおよびヒト型化抗TF抗体はともにこれらの変化をほぼ同様に強く抑制した。

この結果から、ヒト型化抗TF抗体は抗血栓薬として有用なことが示された。

表 7

測定項目	トロンボプラスチン非投与正常群	溶媒投与対照群	キメラ抗体投与群	ヒト型化抗体投与群
血小板数 ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	115.5 $\pm$ 11.8	82.9 $\pm$ 14.3	100.7 $\pm$ 12.9	96.1 $\pm$ 13.3
aPTT(sec)	20.1 $\pm$ 1.1	36.2 $\pm$ 13.9	22.3 $\pm$ 0.7 <sup>a)</sup>	21.8 $\pm$ 1.3 <sup>a)</sup>
フィブリノーゲン濃度 (正常群を100%)	100.0 $\pm$ 4.2	64.8 $\pm$ 20.0	101.0 $\pm$ 6.6 <sup>a)</sup>	98.9 $\pm$ 5.7 <sup>a)</sup>
sFMC濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	74.2 $\pm$ 5.5	3517 $\pm$ 3645	129.9 $\pm$ 46.8 <sup>a)</sup>	66.5 $\pm$ 23.0 <sup>a)</sup>
TAT濃度 (ng/ml)	3.4 $\pm$ 0.6	29.6 $\pm$ 31.0	3.8 $\pm$ 0.7 <sup>b)</sup>	4.2 $\pm$ 0.9

(平均値 $\pm$ 標準偏差)

溶媒投与対照群に対する差の有意性 : a): $p < 0.01$ , b): $p < 0.05$

参考例 1. 抗TFモノクローナル抗体の作製

## 1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法(Ito, T.ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993)に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を10 mM塩化ベンザミジン、1 mMフッ化フェニルメチルスルホン、1 mMジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩液(TBS, pH 7.5)中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を2% Triton X-100を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

この上清から Concanavalin A-Sepharose 4Bカラム(Pharmacia)および抗TF抗体を結合させた Sepharose 4Bカラム(Pharmacia)を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜(PM-10, Amicon)で濃縮し、精製標品として4℃で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体(American Diagnostica)とポリクローナル抗体(American Diagnostica)を組合せた Sandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

## 2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF(約70  $\mu$ g/ml)を等容量の Freundの完全アジュバント(Difco)と混合後、5週齢の Balb/c系雄性マウス(日本チャールスリバー)の腹部皮下に、TFとして10  $\mu$ g/マウスとなるように免疫した。12, 18及び25日にはF

r e u n d の不完全アジュバントと混合した T F を  $5 \mu g$  / マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として 32 日に P B S で希釈した T F 溶液を  $5 \mu g$  / マウスで腹腔内投与した。

最終免疫の 3 日後に 4 匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で 1 / 5 のマウスミエローマ細胞株 P 3 U 1 とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を 10 % ウシ胎仔血清を含む R P M I - 1 6 4 0 培地（以下 R P M I - 培地とする）（Lifetechnologies）に懸濁し、96 穴プレートに 1 匹のマウスにつき 400 穴（約 400 個 / 穴）播種した。融合後、1, 2, 3, 5 日目に培地の半量を H A T（大日本製薬）および conditioned H1 (Boehringer Mannheim GmbH) を含む R P M I - 培地（以下 H A T - 培地とする）に交換することで、ハイブリドーマの H A T 選択を行った。

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは 2 回の限界希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96 穴プレート 2 枚に一穴あたり 0.8 個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示した T F 結合活性と T F 中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンは H A T - 培地から R P M I - 培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、T F / ファクター V I I a 複合体とファクター X との結合を強く阻害する抗体 6 種（A T R - 2, 3, 4, 5, 7 及び 8）を産生するハイブリドーマが樹立できた。

### 3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、in vitro で継代したハイブリドーマ  $10^6$  個を、あらかじめ鉱物油を 2 回腹腔内に投与しておいた B a l b / c 系雄性マウス

の腹腔内に移植した。移植後 1 ～ 2 週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、Protein Aカラム（日本ガイシ）を装着した ConSepLC100システム（Millipore）を用いて行った。

#### 4. C e l l - E L I S A

TFを高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株 J 8 2 (Fair D. S. ら、J. Biol. Chem., 262, 11692-11698, 1987) を A T C C より導入し、R P M I - 培地中、37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度の条件で継代・維持した。

C e l l - E L I S A 用プレートは、96穴プレートに J 8 2 細胞を 10<sup>5</sup> 個／穴の濃度で播種し、上記条件で1日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液（P B S）で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液（P F A）を加えて氷冷下で10分静置することで固定化することによって作製した。P F Aを除去し、P B Sで洗浄後、1% B S A および 0.02% アジ化ナトリウムを含む T r i s 緩衝液（Blocking緩衝液）を加えて、使用時まで4℃で保存した。

C e l l - E L I S A は以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートからBlocking緩衝液を除去し、抗TF抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で1.5時間反応させた。0.05% T w e e n 2 0 を含む P B S で洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウス I g G (H+L) (Zymed) を1時間反応させ、洗浄後、1mg/mlのp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム(Sigma)を添加して1時間後に405nmにおける吸光度を測定することで、J 8 2 細胞に結合した抗TF抗体量を定量した。

#### 5. ファクター X a 活性を指標としたTF中和活性測定系



50  $\mu$ l の 5 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1% ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS: pH 7.6) に 10  $\mu$ l のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液 (5 mg/ml) (Thromborel S) (Boehring) と 10  $\mu$ l のファクター VIIa 溶液 (82.5 ng/ml) (American Diagnostica) を添加し、室温で 1 時間反応させることで TF/Factor VIIa 複合体を形成させた後、10  $\mu$ l の所定濃度に希釈した抗 TF 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および 10  $\mu$ l の Factor X 溶液 (3.245  $\mu$ g/ml) (Celsus Laboratorise) を添加して 45 分間反応させ、0.5 M EDTA を 10  $\mu$ l 添加することで反応を止めた。ここに 2 mM S-2222 溶液 (第一化学薬品) を 50  $\mu$ l 添加し、30 分間の 405 nm における吸光度変化をもって TF の Factor Xa 産生活性とした。この方法では、TF/Factor VIIa 複合体と Factor X との結合を阻害する抗体の活性は測定できる。

#### 6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿 (コージンバイオ) を用い、この 100  $\mu$ l に適当に希釈した抗 TF 抗体溶液 50  $\mu$ l を混和して 37°C で 3 分間反応させた後、50  $\mu$ l のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液 (1.25 mg/ml) を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置 (CR-A: Amelung) で測定した。

#### 7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (Amersham 社製) を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を下に示した。

表 8

抗 TF モノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ

ATR-2            IgG1, k

A T R - 3	I g G 1 , k
A T R - 4	I g G 1 , k
A T R - 5	I g G 1 , k
A T R - 7	I g G 2 a , k
A T R - 8	I g G 2 a , k

#### 参考例 2 . 可溶型ヒト T F の作製法

可溶型ヒト T F ( s h T F ) は以下のように作製した。

ヒト T F の貫通領域 ( 2 2 0 番目のアミノ酸 ) 以下を F L A G ペプチド M 2 に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター ( ネオマイシン耐性遺伝子、D H F R 遺伝子を含む ) に挿入し、C H O 細胞に導入した。ヒト T F の c D N A 配列は James H. Morrissey らの報告 ( Cell ( 1987 ) 50, 129-135 ) を参考にした。この可溶型ヒト T F の遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号 1 5 1 に示した。G 4 1 8 により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、s h T F 発現細胞を樹立した。

この細胞を無血清培地 C H O - S - S F M I I ( G I B C O ) で培養し、s h T F を含む培養上清を得た。同容量の 4 0 m M トリス塩酸緩衝液 ( p H 8 . 5 ) で 2 倍に希釈し、2 0 m M トリス塩酸緩衝液 ( p H 8 . 5 ) で平衡化した Q-Sepharose Fast Flow カラム ( 1 0 0 m L , Pharmacia Biotech ) に添加し、0 . 1 M N a C l を含む同緩衝液で洗浄後、N a C l の濃度を 0 . 3 M とし、s h T F をカラムから溶出した。得られた s h T F 画分に終濃度 2 . 5 M となるように硫酸アンモニウムを加え、遠心操作 ( 1 0 , 0 0 0 r p m 、 2 0 分 ) により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清を Butyl TOYOPEARL ( 3 0 m L , T O S O H ) に添加し、2 . 5 M の硫酸アンモニウムを含む 5 0 m M トリス塩酸緩衝液 ( p H 6 . 8 ) で洗浄した。5

0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中、硫酸アンモニウム濃度を 2.5 M から 0 M まで直線的に下げ、shTF を溶出させた。shTF を含むピーク画分を Centri-Prep 10 (アミコン) で濃縮した。150 mM NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した TSK gel G3000 SWG カラム (21.5 × 600 mm, TOSOH) に濃縮液を添加し、shTF のピーク画分を回収した。これを 0.22 μm のメンブランフィルターで濾過滅菌し、可溶性ヒトTF (shTF) とした。試料の吸光度 280 nm のモル吸光係数を  $\epsilon = 40,130$ 、分子量を 43,210 として、試料の濃度を算出した。

#### 配列表フリーテキスト

配列表の < 223 > に記載した内容は次の通りである。

配列番号 : 1 : プライマー MHC-G1

配列番号 : 2 : プライマー MHC-G2a

配列番号 : 3 : プライマー MKC

配列番号 : 4 : M13 プライマー M4

配列番号 : 5 : M13 プライマー RV

配列番号 : 6 : 抗-TF マウスモノクローナル抗体 ATR-2 の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 7 : 抗-TF マウスモノクローナル抗体 ATR-3 の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 8 : 抗-TF マウスモノクローナル抗体 ATR-4 の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 9 : 抗-TF マウスモノクローナル抗体 ATR-5 の H

鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基  
配列

配列番号 : 1 0 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 7 の  
H 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 1 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 8 の  
H 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 2 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 2 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 3 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 3 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 4 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 4 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 5 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 5 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 6 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 7 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 7 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 8 の  
L 鎖 V 領域のアミノ酸配列及びそれをコードする  
塩基配列

配列番号 : 1 8 : プライマー c h 5 H S

配列番号 : 19 : プライマー c h 5 H A

配列番号 : 20 : プライマー c h 5 L S

配列番号 : 21 : プライマー c h 5 L A

配列番号 : 22 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 1  
S

配列番号 : 23 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 2  
8

配列番号 : 24 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 4  
S

配列番号 : 25 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 3  
A

配列番号 : 26 : C D R グラフィティングプライマー h R 5 H v 5  
A

配列番号 : 27 : プライマー h R 5 H v P r S

配列番号 : 28 : プライマー h R 5 H v P r A

配列番号 : 29 : ヒト型化H鎖V領域バージョン "a" のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 30 : ヒト型化H鎖V領域バージョン "a" のアミノ酸  
配列

配列番号 : 31 : F R シャッフリングプライマー F 3 R F F S

配列番号 : 32 : F R シャッフリングプライマー F 3 R F B S

配列番号 : 33 : F R シャッフリングプライマー F 3 R F F A

配列番号 : 34 : F R シャッフリングプライマー F 3 R F B A

配列番号 : 35 : F R シャッフリングプライマー F 3 N M F S

配列番号 : 36 : F R シャッフリングプライマー F 3 N M B S

配列番号 : 37 : F R シャッフリングプライマー F 3 N M F A

配列番号 : 38 : F R シャッフリングプライマー F 3 N M B A

配列番号 : 39 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 40 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“b”のアミノ酸  
配列

配列番号 : 41 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“c”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 42 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“c”のアミノ酸  
配列

配列番号 : 43 : FRシャッフリングプライマーF3EPS

配列番号 : 44 : FRシャッフリングプライマーF3EPA

配列番号 : 45 : プライマーF3PrS

配列番号 : 46 : プライマーF3PrA

配列番号 : 47 : FRシャッフリングプライマーF3vHS

配列番号 : 48 : FRシャッフリングプライマーF3vHA

配列番号 : 49 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“d”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 50 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“d”のアミノ酸  
配列

配列番号 : 51 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“e”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号 : 52 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“e”のアミノ酸  
配列

配列番号 : 53 : FRシャッフリングプライマーF3SSS

配列番号 : 54 : FRシャッフリングプライマーF3SSA

配列番号 : 55 : FRシャッフリングプライマーF3CDS

配列番号 : 56 : FRシャッフリングプライマーF3CDA

配列番号 : 57 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“f”のアミノ酸

## 配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 58 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“f”のアミノ酸  
配列

配列番号： 59 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“g”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 60 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“g”のアミノ酸  
配列

配列番号： 61 : FRシャッフリングプライマーF3ADS

配列番号： 62 : FRシャッフリングプライマーF3ADA

配列番号： 63 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“h”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 64 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“h”のアミノ酸  
配列

配列番号： 65 : FRシャッフリングプライマーF3MMS

配列番号： 66 : FRシャッフリングプライマーF3MMA

配列番号： 67 : FRシャッフリングプライマーF3BMS

配列番号： 68 : FRシャッフリングプライマーF3BMA

配列番号： 69 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“i”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 70 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“i”のアミノ酸  
配列

配列番号： 71 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“j”のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 72 : ヒト型化H鎖V領域バージョン“j”のアミノ酸  
配列

配列番号： 73 : FRシャッフリングプライマーF2MPS

配列番号： 74 : FRシャッフリングプライマーF2MPA

配列番号： 7 5 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b 1” のアミノ  
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 7 6 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b 1” のアミノ  
酸配列

配列番号： 7 7 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “d 1” のアミノ  
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 7 8 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “d 1” のアミノ  
酸配列

配列番号： 7 9 : FRシャッフリングプライマーF 2 V H S

配列番号： 8 0 : FRシャッフリングプライマーF 2 V H A

配列番号： 8 1 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b 3” のアミノ  
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 8 2 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b 3” のアミノ  
酸配列

配列番号： 8 3 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “d 3” のアミノ  
酸配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 8 4 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “d 3” のアミノ  
酸配列

配列番号： 8 5 : FRシャッフリングベクターL v 1 S

配列番号： 8 6 : FRシャッフリングベクターh 5 L v 4 S

配列番号： 8 7 : FRシャッフリングベクターh 5 L v 2 A

配列番号： 8 8 : FRシャッフリングベクターh 5 L v 3 A

配列番号： 8 9 : FRシャッフリングプライマーh 5 L v 5 A

配列番号： 9 0 : プライマーh 5 L v S

配列番号： 9 1 : プライマーh 5 L v A

配列番号： 9 2 : ヒト型化L鎖V領域バージョン “a” のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列



配列番号： 9 3 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “a” のアミノ酸  
配列

配列番号： 9 4 : F R シャッフリングプライマー F 3 S S

配列番号： 9 5 : F R シャッフリングプライマー F 3 S A

配列番号： 9 6 : F R シャッフリングプライマー F 3 R S

配列番号： 9 7 : F R シャッフリングプライマー F 3 R A

配列番号： 9 8 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b” のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 9 9 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b” のアミノ酸  
配列

配列番号： 1 0 0 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “c” のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 1 0 1 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “c” のアミノ酸  
配列

配列番号： 1 0 2 : F R シャッフリングプライマー F 2 S S

配列番号： 1 0 3 : F R シャッフリングプライマー F 2 S A

配列番号： 1 0 4 : F R シャッフリングプライマー F 2 X S

配列番号： 1 0 5 : F R シャッフリングプライマー F 2 X A

配列番号： 1 0 6 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b 1” のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 1 0 7 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b 1” のアミノ酸  
配列

配列番号： 1 0 8 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b 2” のアミノ酸  
配列及びそれをコードする塩基配列

配列番号： 1 0 9 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “b 2” のアミノ酸  
配列

配列番号： 1 1 0 : ヒト型化 H 鎖 V 領域全バージョンの F R 1 のア

## ミノ酸配列

配列番号： 1 1 1 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “a” ~ “j”  
のFR2のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 2 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b1” 及び “  
d1” のFR2のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 3 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b3” 及び “  
d3” のFR2のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 4 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “a” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 5 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “b”, “b1”  
及び “b3” のFR3のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 6 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “c” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 7 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “d”, “d1”  
及び “d3” のFR3のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 8 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “e” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 1 9 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “f” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 0 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “g” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 1 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “h” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 2 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “i” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 3 : ヒト型化H鎖V領域バージョン “j” のFR3  
のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 4 : ヒト型化 H 鎖 V 領域全バージョンの F R 4 のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 5 : ヒト型化 L 鎖 V 領域全バージョンの F R 1 のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 6 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ a ” , “ b ” 及び “ c ” の F R 2 のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 7 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ b 1 ” の F R 2 のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 8 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ b 2 ” の F R 2 のアミノ酸配列

配列番号： 1 2 9 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ a ” の F R 3 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 0 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ b ” , “ b 1 ” 、 及び “ b 2 ” の F R 3 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 1 : ヒト型化 L 鎖 V 領域バージョン “ c ” の F R 3 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 2 : ヒト型化 L 鎖 V 領域全バージョン F R 4 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 3 : ヒト型化 H 鎖 V 領域全バージョン C D R 1 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 4 : ヒト型化 H 鎖 V 領域全バージョンの C D R 2 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 5 : ヒト型化 H 鎖 V 領域全バージョンの C D R 3 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 6 : ヒト型化 L 鎖 V 領域全バージョンの C D R 1 のアミノ酸配列

配列番号： 1 3 7 : ヒト型化 L 鎖 V 領域全バージョンの C D R 2 の

## アミノ酸配列

配列番号： 1 3 8 : ヒト型化 L 鎖 V 領域全バージョンの C D R 3 の  
アミノ酸配列

配列番号： 1 3 9 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 2  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 0 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 3  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 1 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 4  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 2 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 5  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 3 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 7  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 4 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 8  
の H 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 5 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 2  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 6 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 3  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 7 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 4  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 8 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 5  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 4 9 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 7  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 5 0 : 抗-T F マウスモノクローナル抗体 A T R - 8  
の L 鎖 V 領域のアミノ酸配列

配列番号： 1 5 1 : 可溶型ヒト T F のアミノ酸配列及びそれをコー  
ドする塩基配列

配列番号： 1 5 2 : 可溶型ヒト T F のアミノ酸配列

## 請 求 の 範 囲

1. ヒト組織因子 (TF) に対するマウスモノクローナル抗体のヘビー (H) 鎖可変 (V) 領域と、ヒト抗体 H 鎖不変 (C) 領域とを含んで成るキメラ H 鎖であって、前記 H 鎖 V 領域が、

(1) 配列番号：139 のアミノ酸配列 (ATR-2)、

(2) 配列番号：140 のアミノ酸配列 (ATR-3)、

(3) 配列番号：141 のアミノ酸配列 (ATR-4)、

(4) 配列番号：142 のアミノ酸配列 (ATR-5)、

(5) 配列番号：143 のアミノ酸配列 (ATR-7)、

(6) 配列番号：144 のアミノ酸配列 (ATR-8)、

のいずれかのアミノ酸配列を有する、キメラ H 鎖。

2. 前記 H 鎖 V 領域が、配列番号 142 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のキメラ H 鎖。

3. 前記 H 鎖 C 領域が、C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 又は C $\gamma$ 4 領域である請求項 1 又は 2 に記載のキメラ H 鎖。

4. 前記 H 鎖 V 領域が配列番号：142 のアミノ酸配列を有し、そして前記 H 鎖 C 領域が C $\gamma$ 4 である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のキメラ H 鎖。

5. ヒト TF に対するマウスモノクローナル抗体のライト (L) 鎖 V 領域と、ヒト抗体 L 鎖 C 領域とを含んで成るキメラ L 鎖であって、前記 L 鎖 V 領域が、

(1) 配列番号：145 のアミノ酸配列 (ATR-2)、

(2) 配列番号：146 のアミノ酸配列 (ATR-3)、

(3) 配列番号：147 のアミノ酸配列 (ATR-4)、

(4) 配列番号：148 のアミノ酸配列 (ATR-5)、

(5) 配列番号：149 のアミノ酸配列 (ATR-7)、

(6) 配列番号：150のアミノ酸配列(ATR-8)、  
のいずれかのアミノ酸配列を有する、キメラL鎖。

6. 前記L鎖V領域が配列番号：148のアミノ酸配列を有する、  
請求項5に記載のキメラL鎖。

7. 前記L鎖C領域がC $\lambda$ 又はC $\kappa$ 領域である、請求項5又は6  
に記載のキメラL鎖。

8. 前記L鎖V領域が配列番号：148のアミノ酸配列を有し、  
そして前記L鎖C領域がC $\kappa$ である記載項5～7のいずれか1項に  
記載のキメラL鎖。

9. 請求項1～4のいずれか1項に記載のキメラH鎖及び請求項  
5～8のいずれか1項に記載のキメラL鎖を含んで成る、ヒトTF  
に対するキメラ抗体。

10. 請求項4に記載のキメラH鎖及び請求項8に記載のキメラ  
L鎖を含んで成る、ヒトTFに対するキメラ抗体。

11. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域  
相補性決定領域(CDR)及びヒト抗体H鎖V領域フレームワーク  
領域(FR)を含んで成るヒト型化H鎖V領域において、前記CD  
Rが、次のアミノ酸配列：

H-CDR1 : Asp Tyr Tyr Met His (配列番号：133)

H-CDR2 : Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr  
Asp Pro Lys Phe Gln Gly (配列番号：134)

H-CDR3 : Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (配列番号：  
135)

を有する、ヒト型化H鎖V領域。

12. 前記FRが次のアミノ酸配列：

H-FR1 : Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu  
Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys

Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (配列番号 : 1  
1 0)

H-F R 2 : 次の配列 (1) ~ (3) のいずれか :

(1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly (配列番号 : 1 1 1)

(2) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
Gly (配列番号 : 1 1 2)

(3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
Gly (配列番号 : 1 1 3)

H-F R 3 : 次の配列 (1) ~ (10) のいずれか :

(1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala  
Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala  
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 4)

(2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala  
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala  
Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 5)

(3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 6)

(4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala  
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala  
Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 7)

(5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala  
Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala  
Val Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 8)

(6) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala  
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala



Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 1 9)

(7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala  
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala  
Val Tyr Ser Cys Ala Arg (配列番号 : 1 2 0)

(8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala  
Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala  
Ile Tyr Phe Cys Ala Arg (配列番号 : 1 2 1)

(9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val  
Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala  
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 2 2)

(10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr  
Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (配列番号 : 1 2 3  
)

FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
Ser (配列番号 : 1 2 4)

を有する、ヒト型化H鎖V領域。

13. 配列番号 : 30 (バージョンa)、配列番号 : 40 (バージョンb)、配列番号 : 42 (バージョンc)、配列番号 : 50 (バージョンd)、配列番号 : 52 (バージョンe)、配列番号 : 58 (バージョンf)、配列番号 : 60 (バージョンg)、配列番号 : 64 (バージョンh)、配列番号 : 70 (バージョンi)、配列番号 : 72 (バージョンj)、配列番号 : 76 (バージョンb1)、配列番号 : 78 (バージョンd1)、配列番号 : 82 (バージョンb3) 又は配列番号 : 84 (バージョンd3) に示すアミノ酸配列を有する、請求項11又は12に記載のヒト型化H鎖V領域。

14. 配列番号 : 40 (バージョンb) のアミノ酸配列を有する

請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載のヒト型化 H 鎖 V 領域。

15. 配列番号：70（バージョン i）のアミノ酸配列を有する、請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載のヒト型化 H 鎖 V 領域。

16. ヒト TF に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域 CDR 及びヒト L 鎖 V 領域 FR を含んで成るヒト型化 L 鎖 V 領域において、前記 CDR が、次のアミノ酸配列：

L-CDR1 : Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser  
(配列番号：136)

L-CDR2 : Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (配列番号：137)

L-CDR3 : Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (配列番号：138) を有する、ヒト型化 L 鎖 V 領域。

17. 前記 FR が次のアミノ酸配列：

L-FR1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu  
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
Cys (配列番号：125)

L-FR2 : 次の配列 (1)～(3) のいずれか：

(1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
Ile Tyr (配列番号：126)

(2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu  
Ile Tyr (配列番号：127)

(3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu  
Ile Tyr (配列番号：128)

L-FR3 : 次の配列 (1)～(3) のいずれか：

(1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号：129)

(2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号: 130)

(3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (配列番号: 131)

L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (配列  
番号: 132)

を有する、請求項16に記載のヒト型化L鎖V領域。

18. 配列番号: 93 (バージョンa)、配列番号: 99 (バージョンb)、配列番号: 101 (バージョンc)、配列番号: 107 (バージョンb1) 又は配列番号: 109 (バージョンb2) に示すアミノ酸配列を有する、請求項16又は17に記載のヒト型化L鎖V領域。

19. 配列番号: 99 (バージョンb) のアミノ酸配列を有する、請求項16～18のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V領域。

20. 配列番号: 109 (バージョンb2) に示すアミノ酸配列を有する、請求項16～18のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V領域。

21. 請求項11～15のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V領域及びヒト抗体H鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化H鎖。

22. 請求項14に記載のヒト型化H鎖V領域 (バージョンb) 及びヒト抗体H鎖C領域を含んで成るヒトTFに対する抗体のヒト型化H鎖。

23. 請求項15に記載のヒト型化H鎖V領域 (バージョンi) 及びヒト抗体のH鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体の

ヒト型化H鎖。

24. 前記ヒト抗体のH鎖C領域が、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 又は $C\gamma 4$ である、請求項21～23のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖。

25. 請求項16～20のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V領域及びヒト抗体L鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。

26. 請求項19に記載のヒト型化L鎖V領域（バージョンb）及びヒト抗体のL鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。

27. 請求項20に記載のヒト型化L鎖V領域（バージョンb2）及びヒト抗体のL鎖C領域を含んで成る、ヒトTFに対する抗体のヒト型化L鎖。

28. 前記ヒト抗体のL鎖C領域が、 $C\lambda$ 又は $C\kappa$ である、請求項25～27のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖。

29. 請求項21～24のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖及び請求項25～28のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

30. 請求項22に記載のヒト型化H鎖（バージョンb）及び請求項26に記載のヒト型化L鎖（バージョンb）を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

31. 請求項23に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）及び請求項26に記載のヒト型化L鎖（バージョンb）を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

32. 請求項23に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）及び請求項27に記載のヒト型化L鎖（バージョンb2）を含んで成る、ヒトTFに対するヒト型化抗体。

33. 請求項1～4のいずれか1項に記載のキメラH鎖をコードするDNA。

34. 請求項2～4のいずれか1項に記載のキメラH鎖をコードするDNA。

35. 請求項5～8のいずれか1項に記載のキメラL鎖をコードするDNA。

36. 請求項6～8のいずれか1項に記載のキメラL鎖をコードするDNA。

37. 請求項11～15のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖V領域をコードするDNA。

38. 請求項14に記載のヒト型化H鎖V領域（バージョンb）をコードするDNA。

39. 請求項15に記載のヒト型化H鎖V領域（バージョンi）をコードするDNA。

40. 請求項16～20のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖V領域をコードするDNA。

41. 請求項19に記載のヒト型化L鎖V領域（バージョンb）をコードするDNA。

42. 請求項20に記載のヒト型化L鎖V領域（バージョンb2）をコードするDNA。

43. 請求項21～24のいずれか1項に記載のヒト型化H鎖をコードするDNA。

44. 請求項22又は24に記載のヒト型化H鎖（バージョンb）をコードするDNA。

45. 請求項23又は24に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）をコードするDNA。

46. 請求項25～28のいずれか1項に記載のヒト型化L鎖を

コードするDNA。

47. 請求項26又は28に記載のヒト型化L鎖（バージョンb）をコードするDNA。

48. 請求項27又は28に記載のヒト型化L鎖（バージョンb2）をコードするDNA。

49. 請求項33に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

50. 請求項34に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

51. 請求項35に記載のキメラL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

52. 請求項36に記載のキメラL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

53. 請求項33に記載のキメラH鎖をコードするDNAと請求項35に記載のキメラL鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

54. 請求項34に記載のキメラH鎖をコードするDNAと請求項36に記載のキメラL鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

55. 請求項43に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

56. 請求項44に記載のヒト型化H鎖（バージョンb）をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

57. 請求項45に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

58. 請求項46に記載のヒト型化L鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

59. 請求項47に記載のヒト型化L鎖（バージョンb）をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

60. 請求項48に記載のヒト型化L鎖（バージョンb2）をコードするDNAを含んで成る発現ベクター。

61. 請求項43に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAと請求項46に記載のヒト型化L鎖をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

62. 請求項44に記載のヒト型化H鎖（バージョンb）をコードするDNAと請求項47に記載のヒト型化L鎖（バージョンh）をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

63. 請求項45に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）と請求項47に記載のヒト型化L鎖（バージョンb）をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

64. 請求項45に記載のヒト型化H鎖（バージョンi）をコードするDNAと請求項48に記載のヒト型化L鎖（バージョンb2）をコードするDNAとを含んで成る発現ベクター。

65. 請求項49に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項51に記載のキメラL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

66. 請求項50に記載のキメラH鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと、請求項52に記載のキメラL鎖をコードする発現ベクターとにより形質転換された宿主。

67. 請求項53に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

68. 請求項54に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

69. 請求項55に記載のヒト型化H鎖をコードするDNAを含

んで成る発現ベクターと、請求項 58 に記載のヒト型化 L 鎖をコードする DNA を含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

70. 請求項 56 に記載のヒト型化 H 鎖（バージョン b）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターと、請求項 59 に記載のヒト型化 L 鎖（バージョン b）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

71. 請求項 57 に記載のヒト型化 H 鎖（バージョン i）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターと、請求項 59 に記載のヒト型化 L 鎖（バージョン b）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

72. 請求項 57 に記載のヒト型化 H 鎖（バージョン i）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターと、請求項 6 に記載のヒト型化 L 鎖（バージョン b2）をコードする DNA を含んで成る発現ベクターとにより形質転換された宿主。

73. 請求項 61 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

74. 請求項 62 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

75. 請求項 63 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

76. 請求項 64 に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

77. 請求項 65 に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒト TF に対するキメラ抗体の製造方法。

78. 請求項 66 に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗



体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。

79. 請求項67に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。

80. 請求項68に記載の宿主を培養し、該培養物からキメラ抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するキメラ抗体の製造方法。

81. 請求項69に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

82. 請求項70に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

83. 請求項71に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

84. 請求項72に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

85. 請求項73に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

86. 請求項74に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

87. 請求項75に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化

抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

88. 請求項76に記載の宿主を培養し、該培養物からヒト型化抗体を採取することを特徴とする、ヒトTFに対するヒト型化抗体の製造方法。

89. 非ヒト由来の相補性決定領域(CDR)及び天然ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)を有する免疫原性を低減させた天然ヒト型化抗体の製造方法において、

(1) 目的とする抗原に対して反応性の非ヒトモノクローナル抗体を用意し、

(2) 前記(1)のモノクローナル抗体中のFRのアミノ酸配列に対して高い相同性を有するヒト抗体を複数用意し、

(3) 前記(2)における1種類のヒト抗体の4個のFRを前記(1)の非ヒトモノクローナル抗体の対応するFRにより置換して第一のヒト型化抗体を作製し、

(4) 前記(3)において作製したヒト型化抗体の抗原への結合性又は抗原の生物活性を中和する能力を測定し、

(5) 前記(3)において作製したヒト型化抗体中の1～3個のFRを、(2)で用意したヒト抗体の内、(3)で使用したものとは異なるヒト抗体の対応するFRにより置換して第二のヒト型化抗体を作製し、

(6) 前記(5)で作製した第二のヒト型化抗体と前記(3)で得た第一のヒト型化抗体とを、抗原に対する結合性、又は抗原の生物活性を中和する能力について比較し、好都合な活性を示すヒト型化抗体を選択し、

(7) 前記(6)で選択されたヒト型化抗体について、前記(3)～(6)の段階を実施し、そして

(8) 前記(1)における非ヒトモノクローナル抗体と同等の活性を有するヒト型化抗体が得られるまで前記(3)～(6)の段階を反復する、  
ことを特徴とする方法。

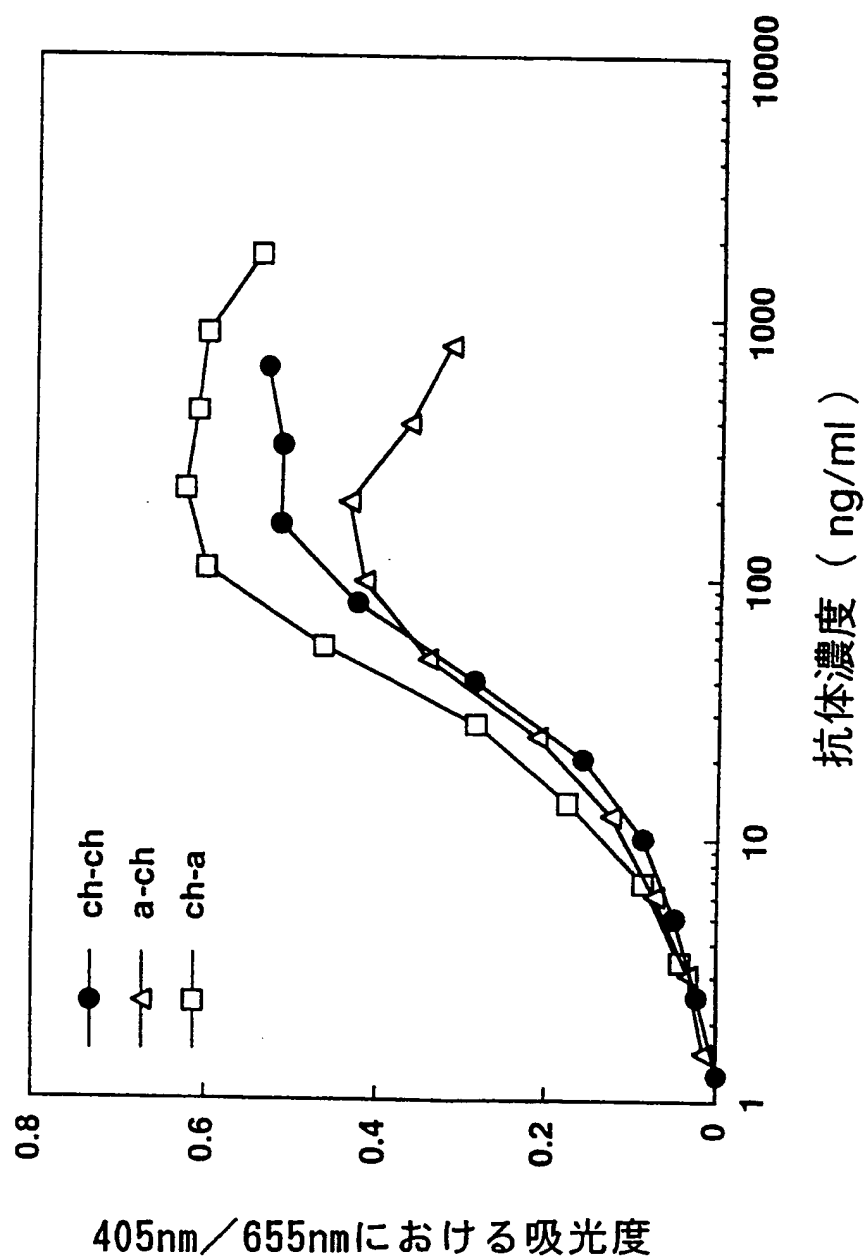
90. 前記目的とする抗原がヒト組織因子(TF)である、請求項89に記載の方法。

91. 請求項89の方法により得られるヒト型化抗体。

92. 請求項90の方法により得られるヒト型化抗体。

93. 請求項29～32及び92のいずれか1項に記載のヒト型化抗体を含んで成る播種性血管内凝固症候群(DIC)治療剤。

Fig.1



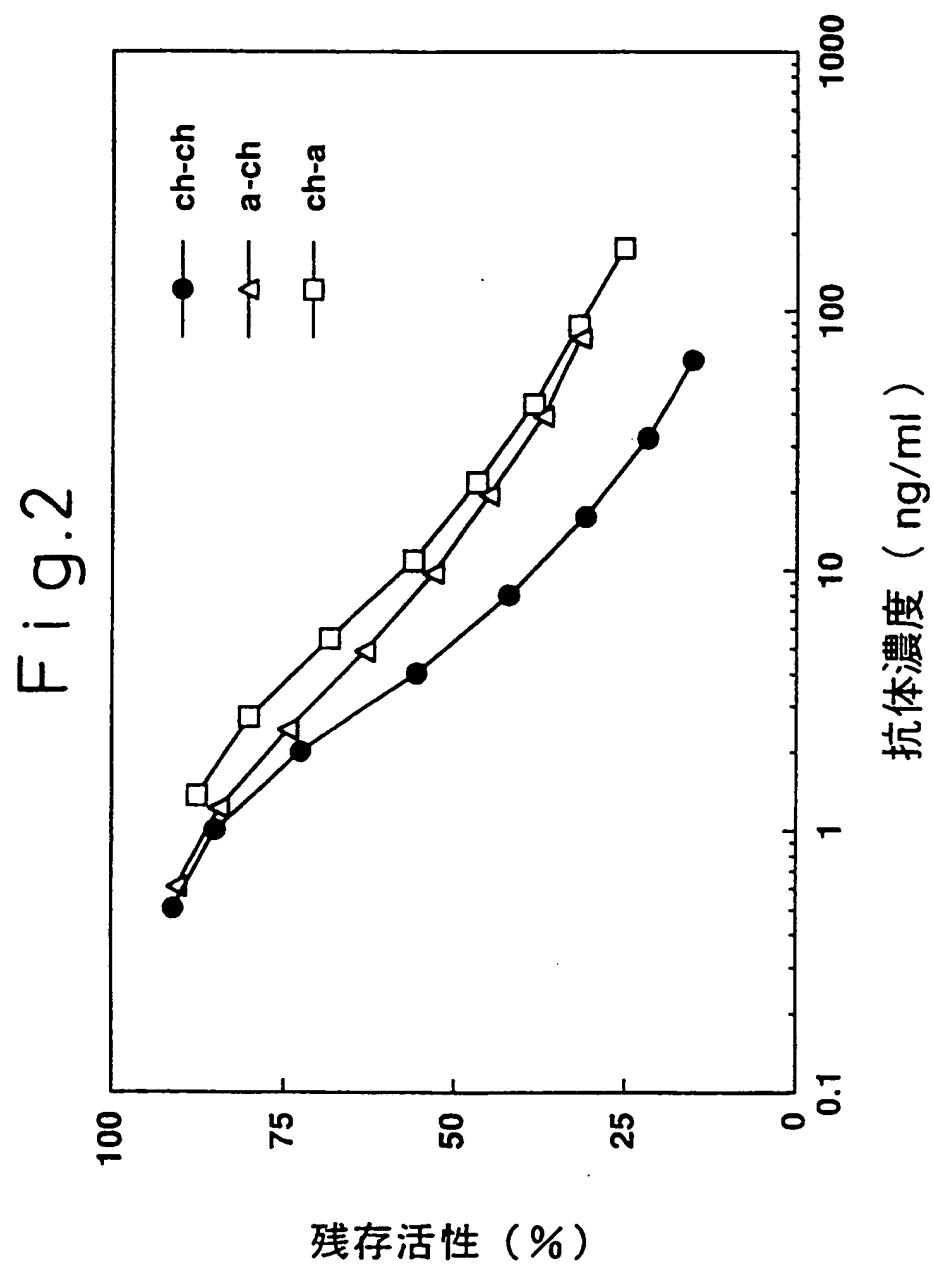


Fig.3

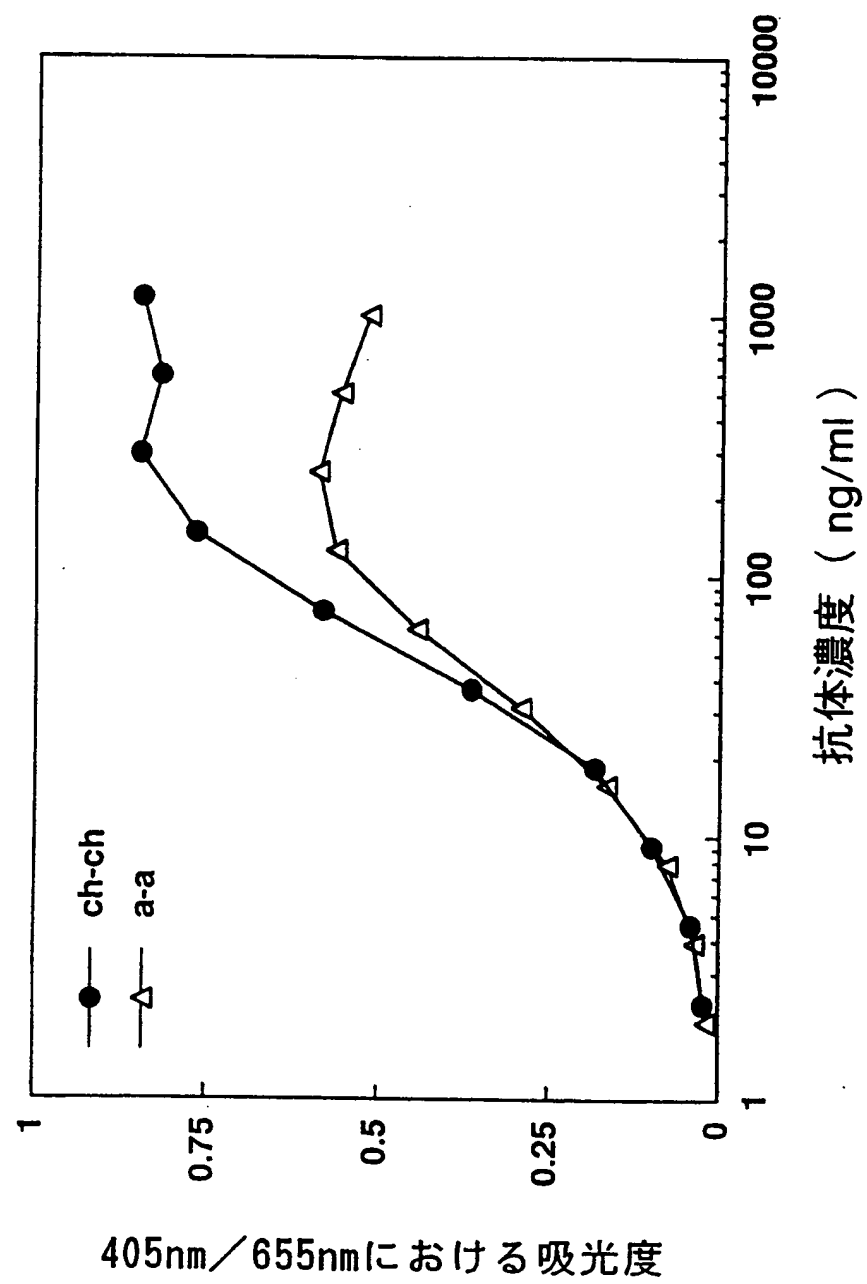


Fig.4

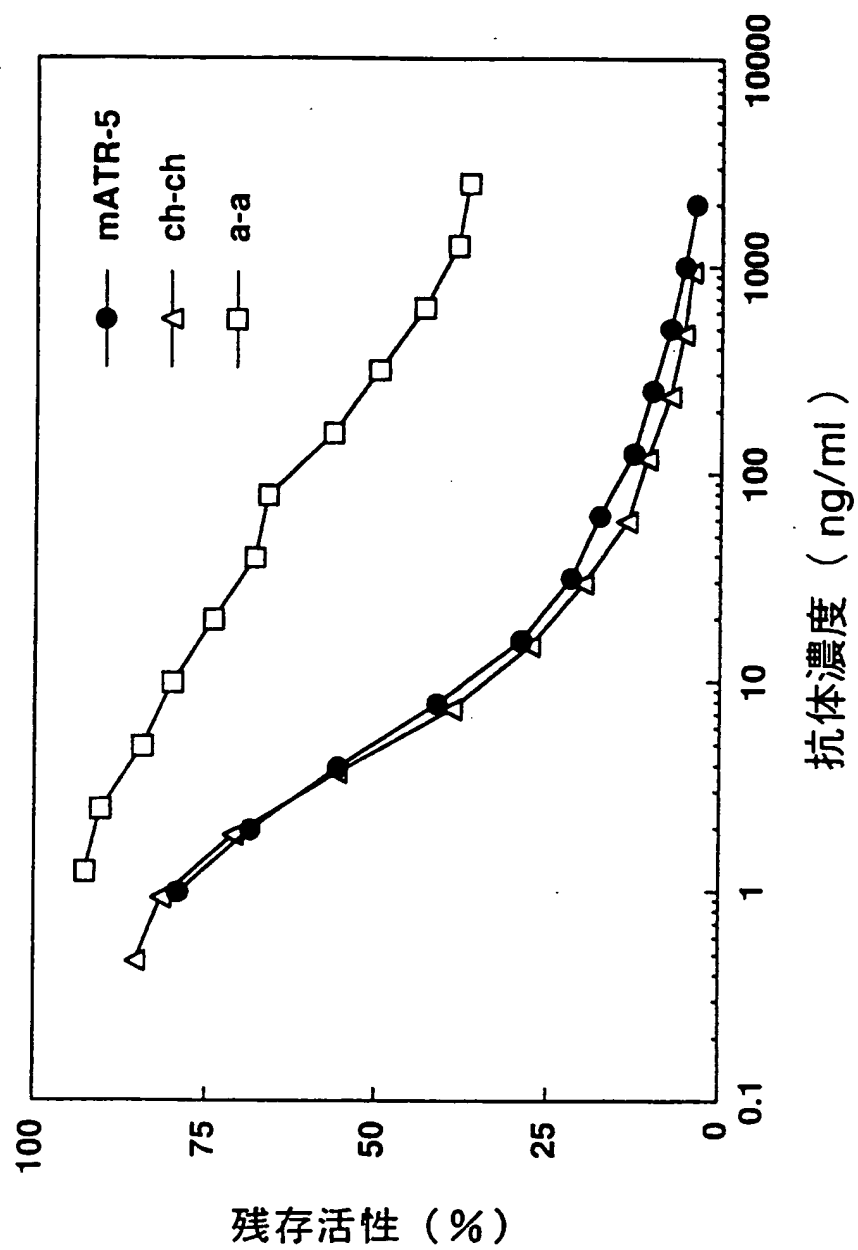
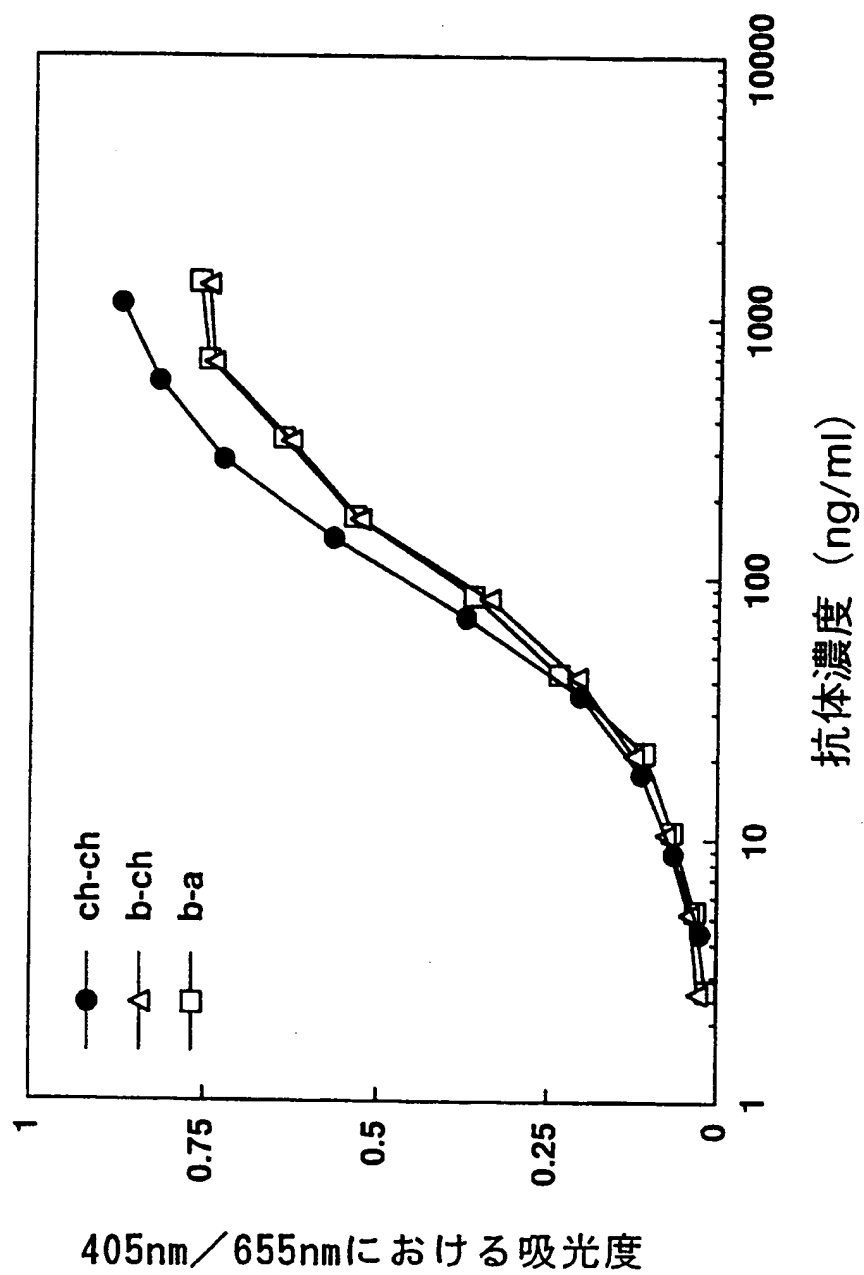


Fig.5





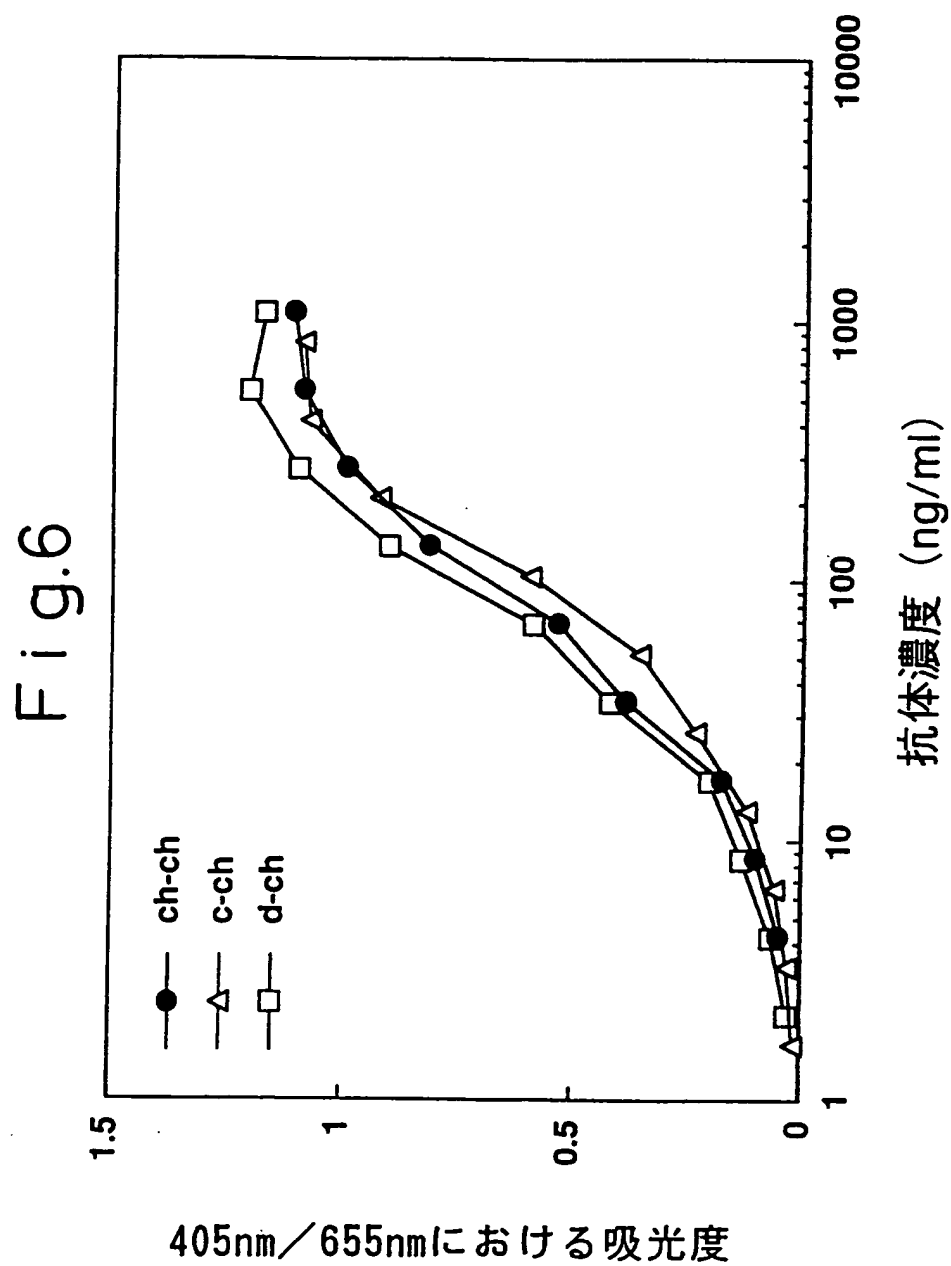
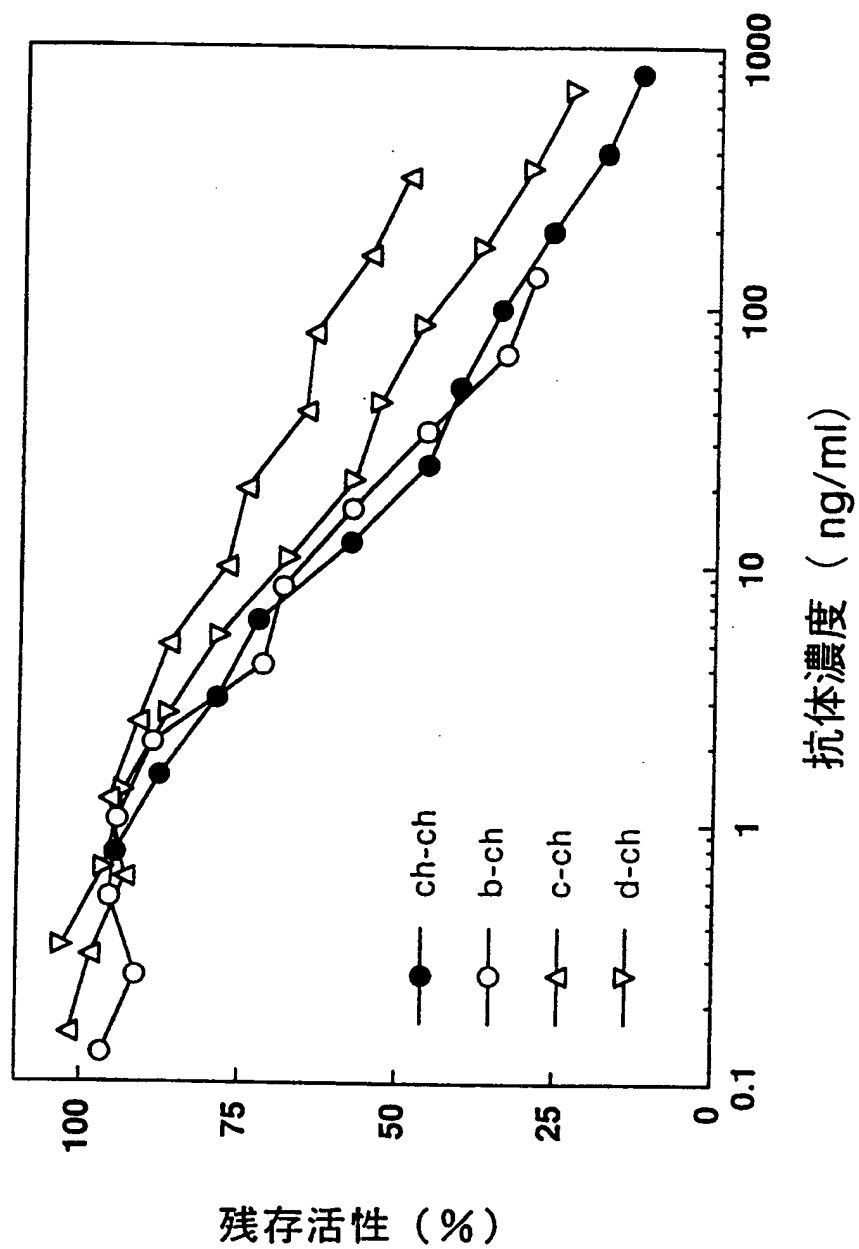
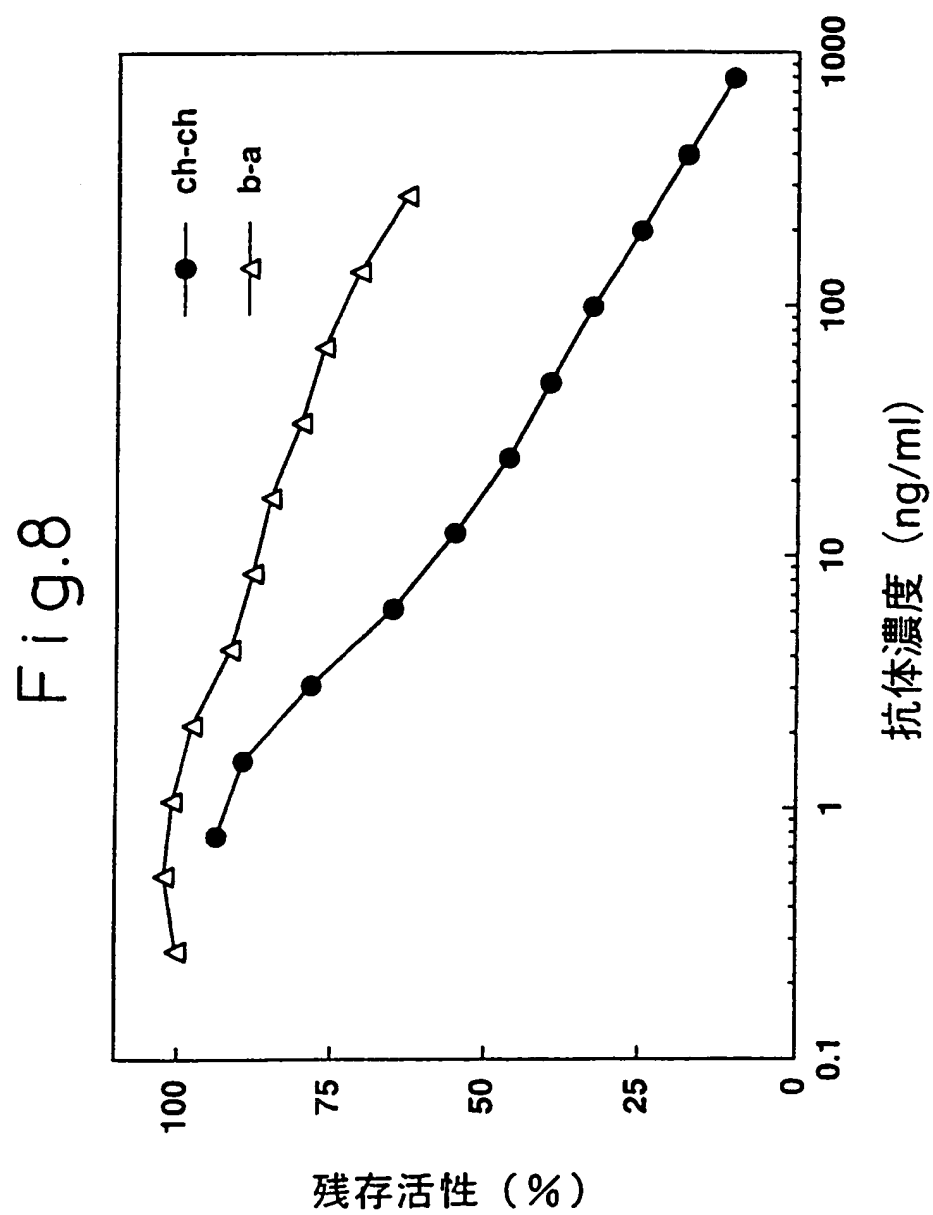
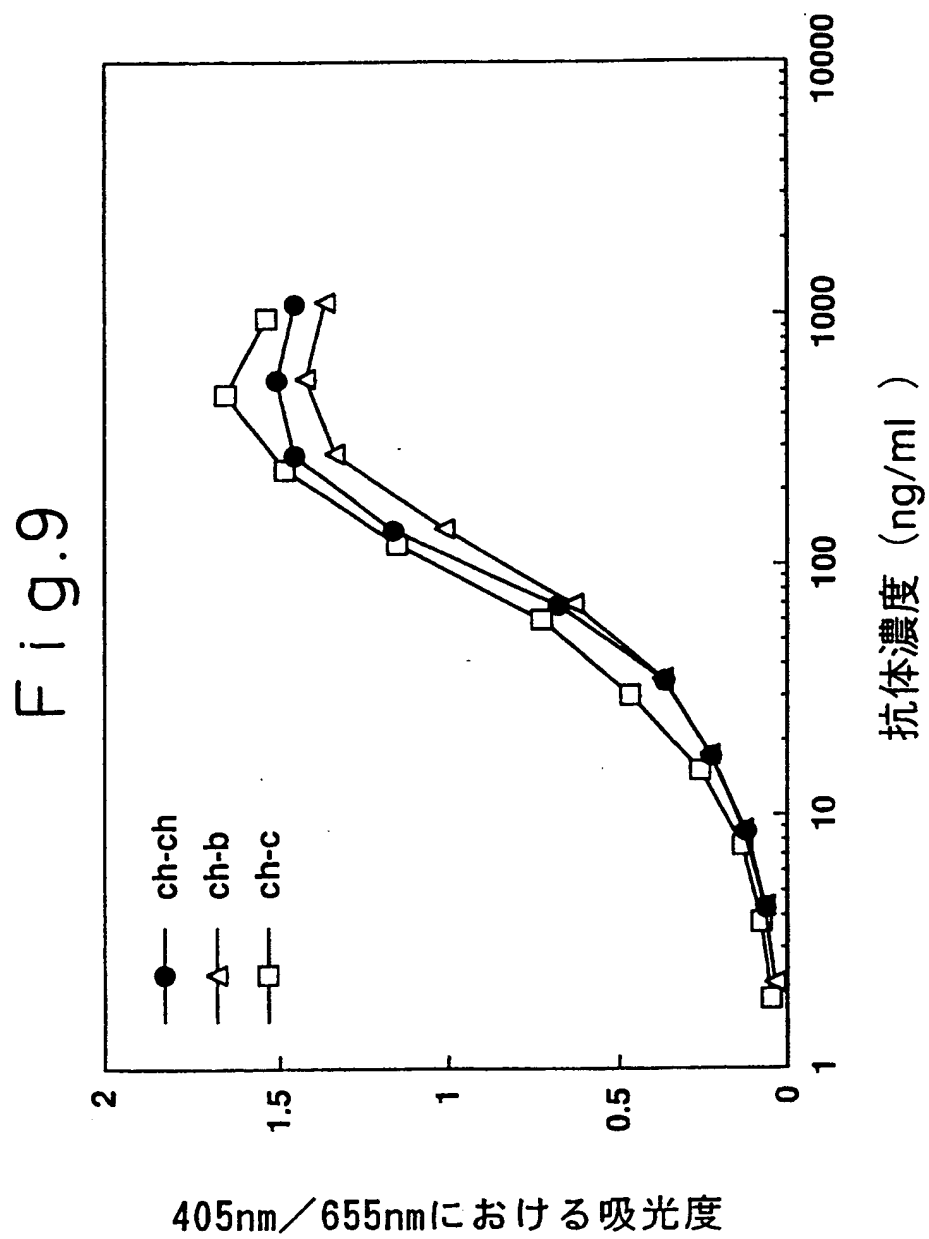
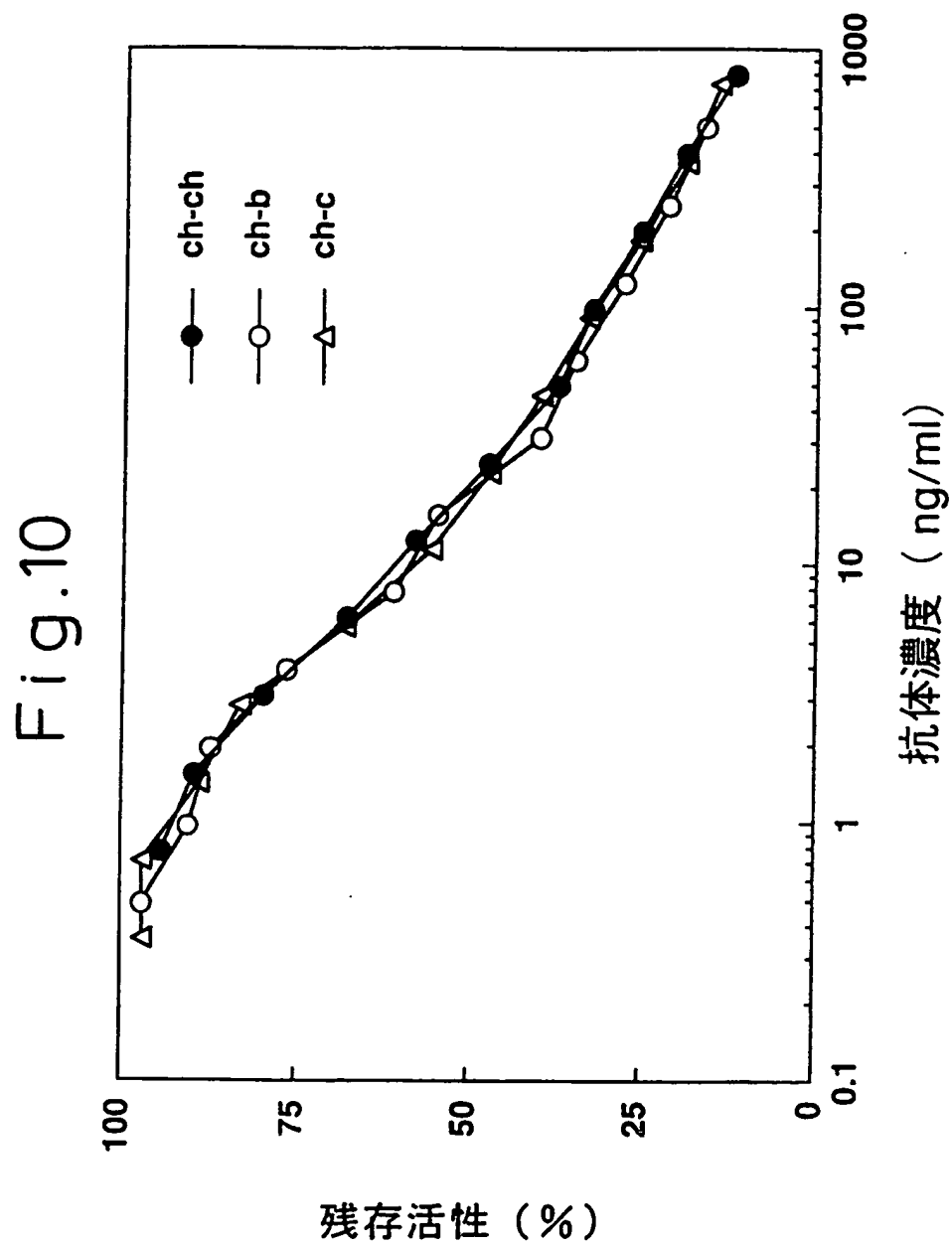


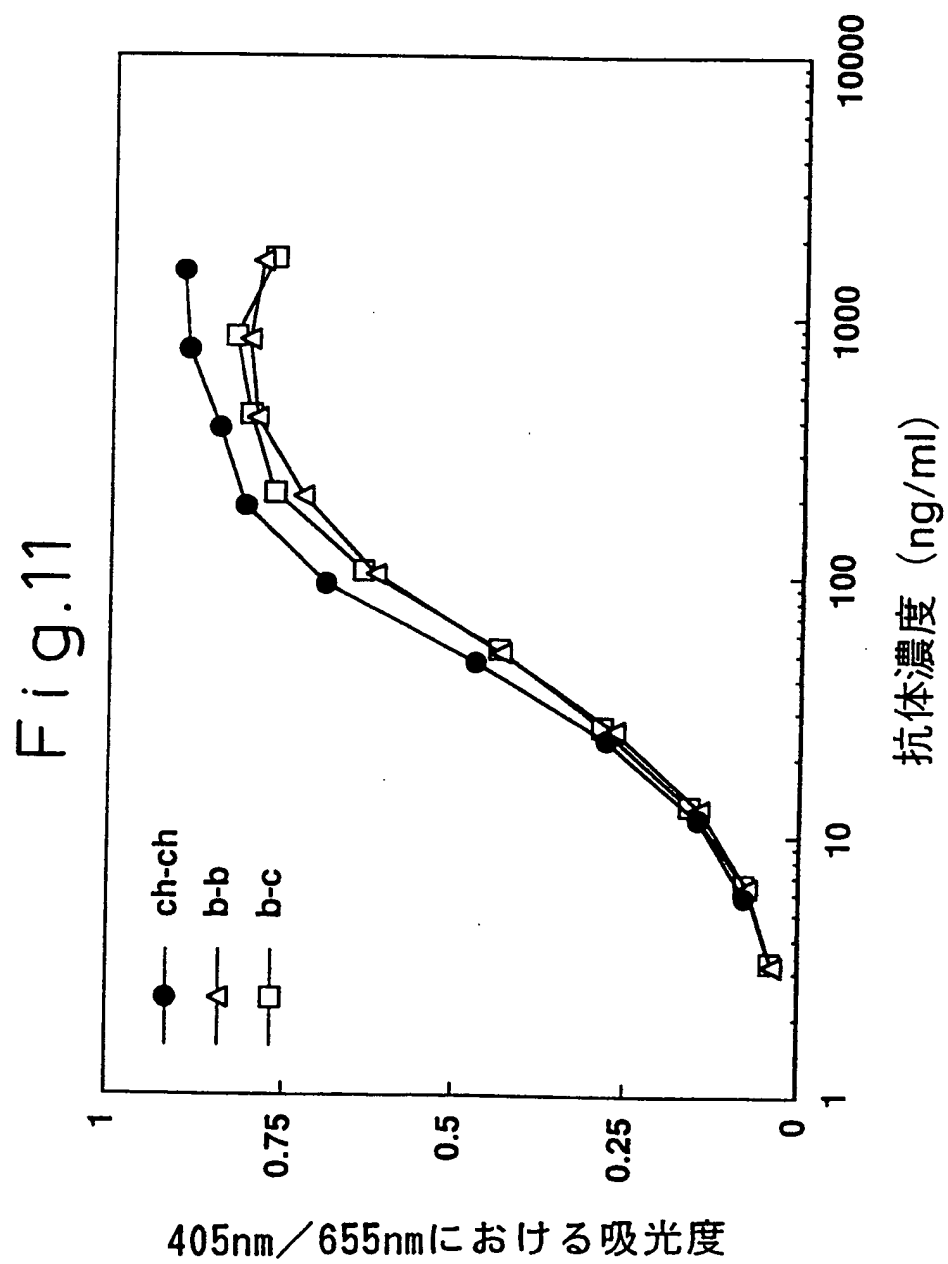
Fig.7

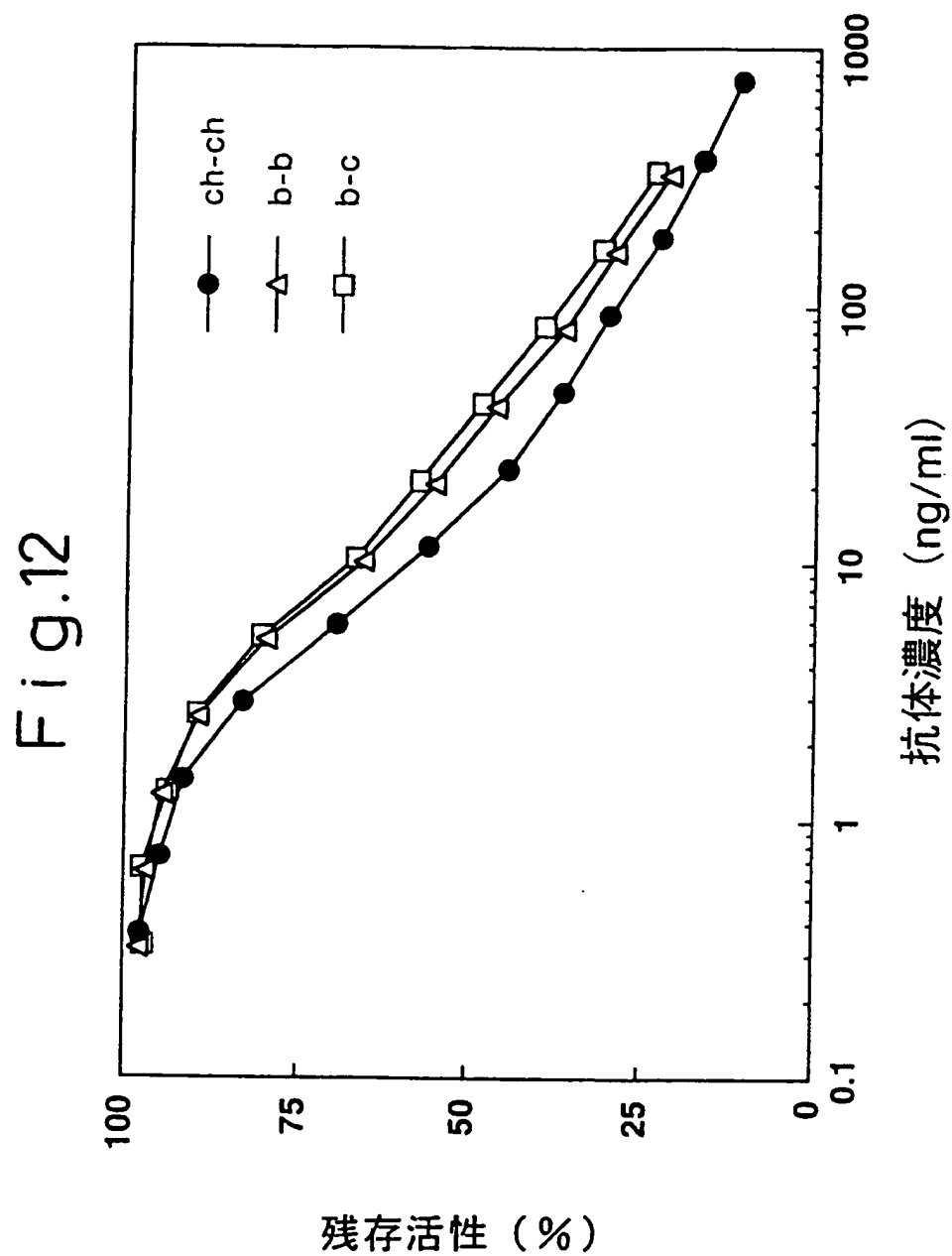












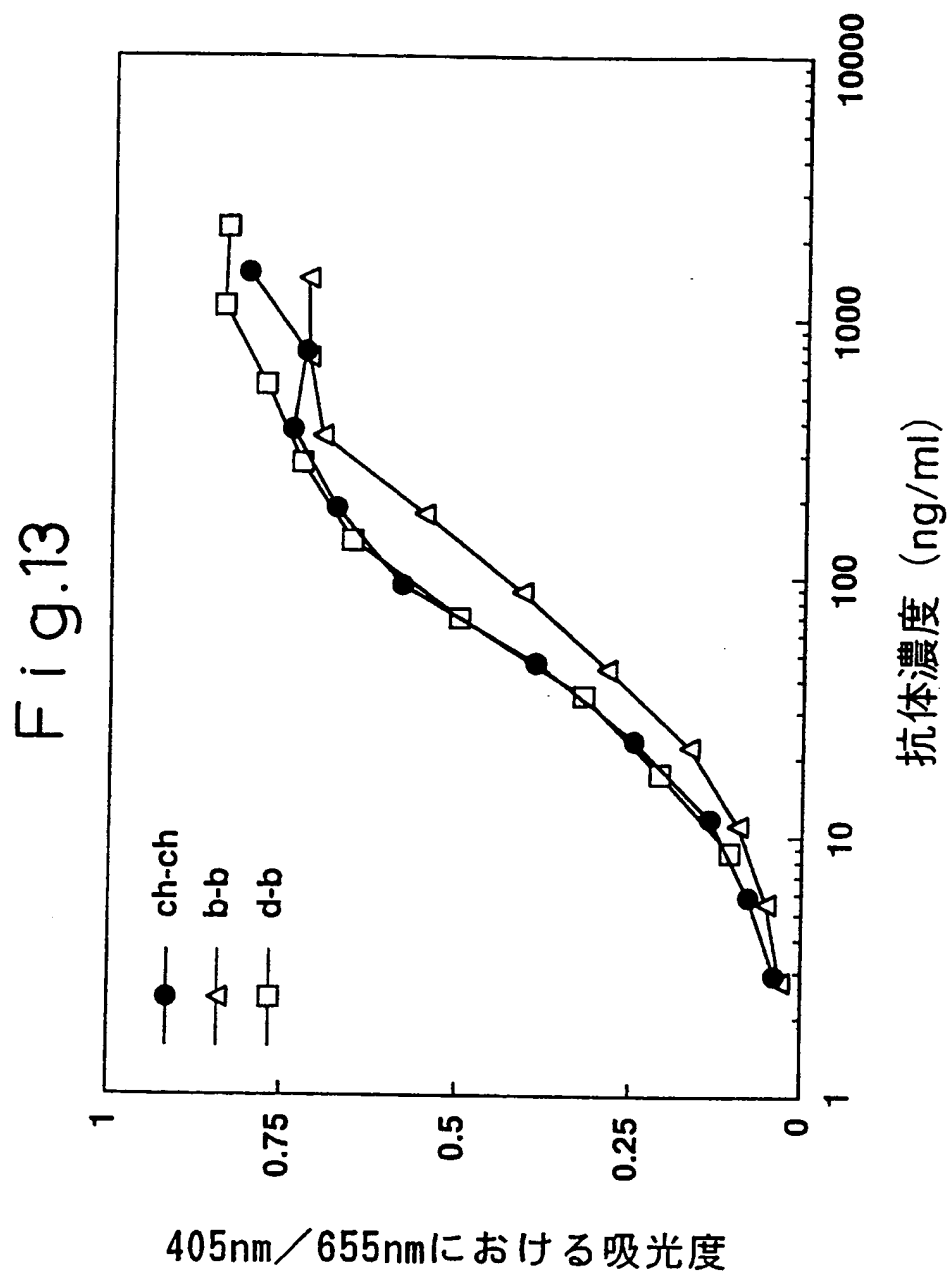
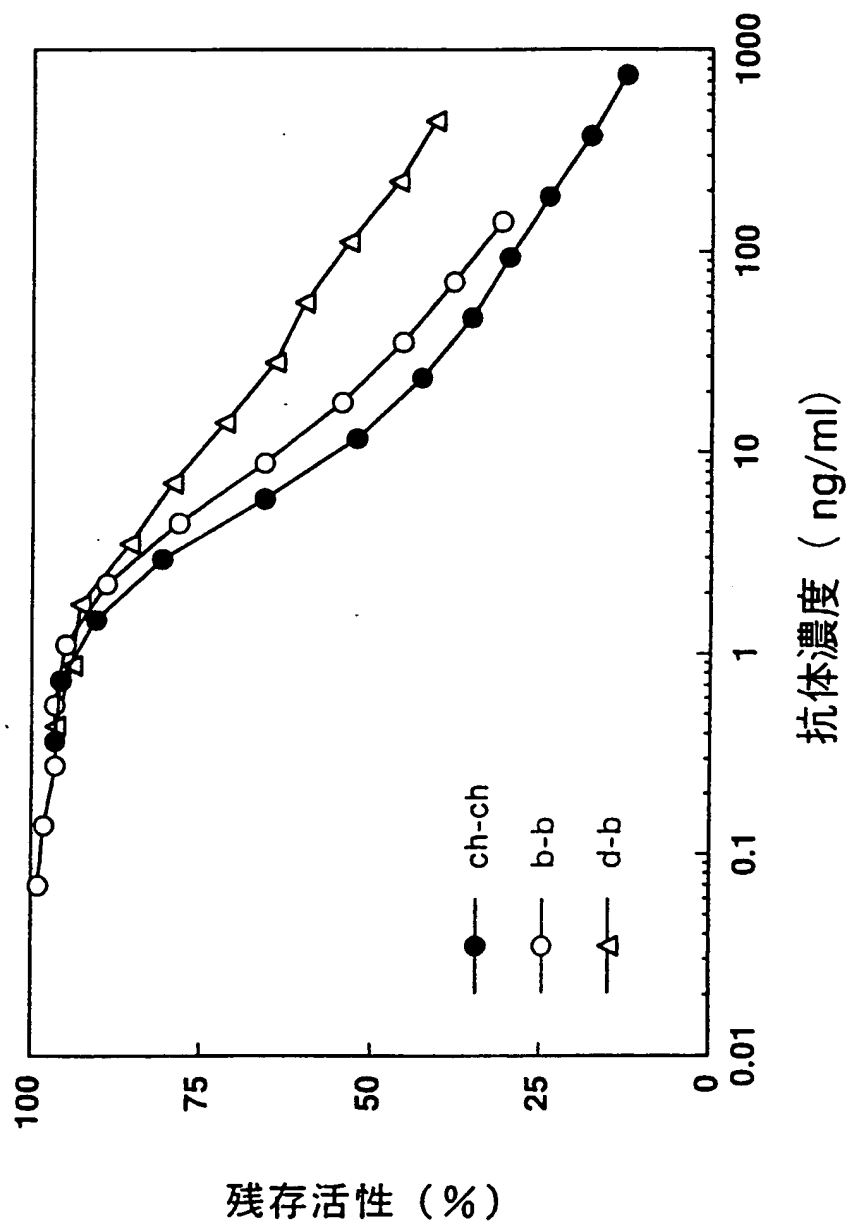
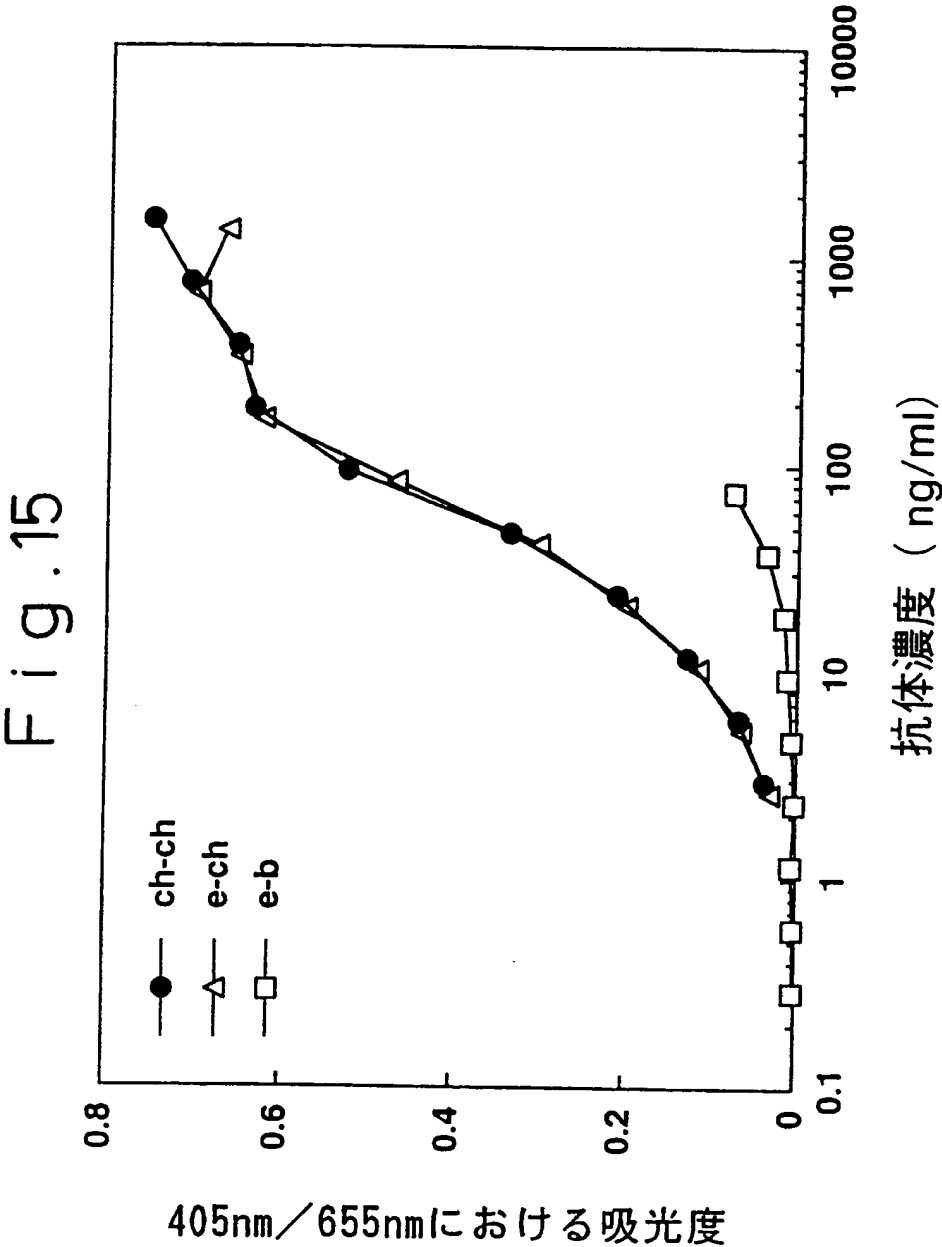




Fig.14





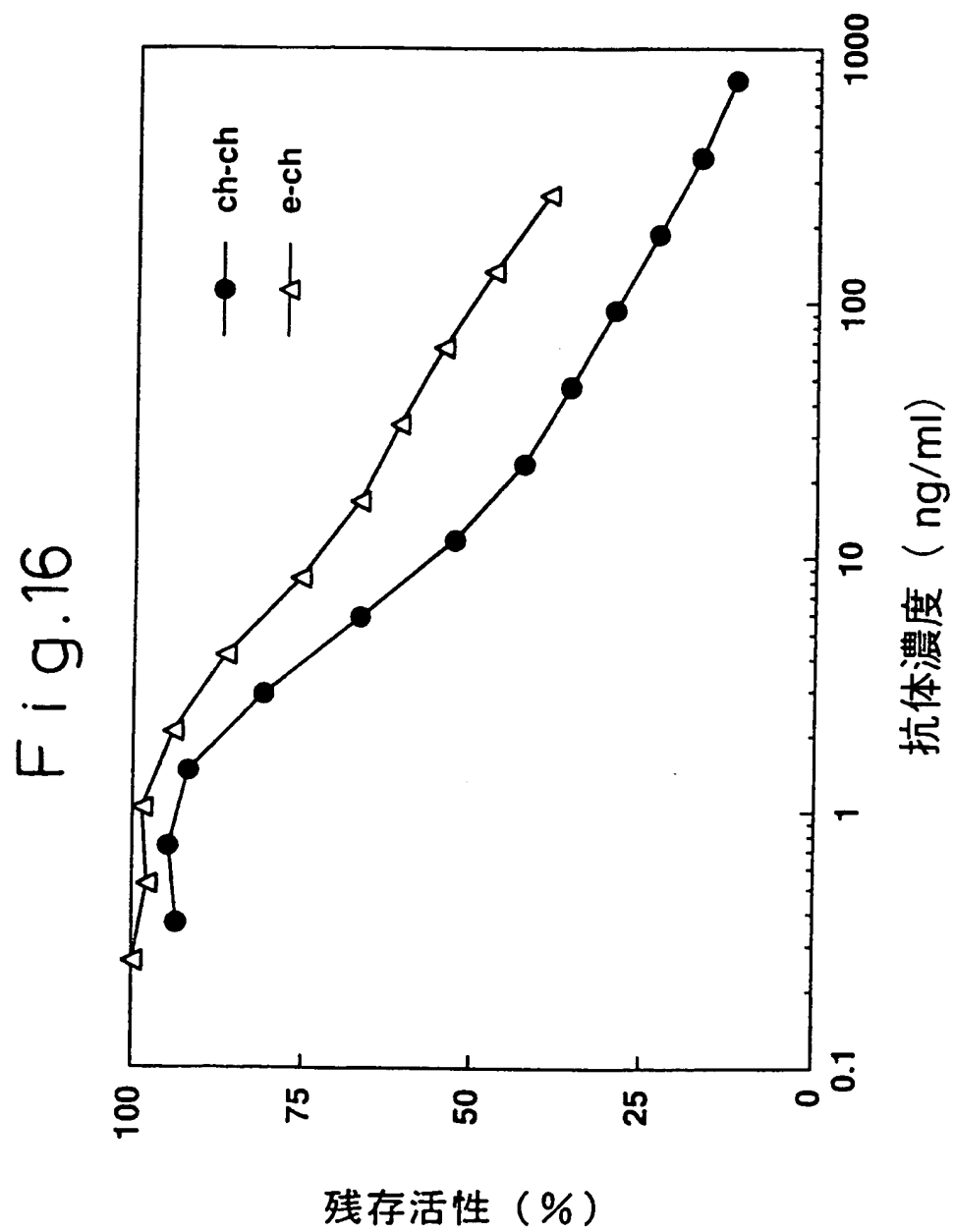
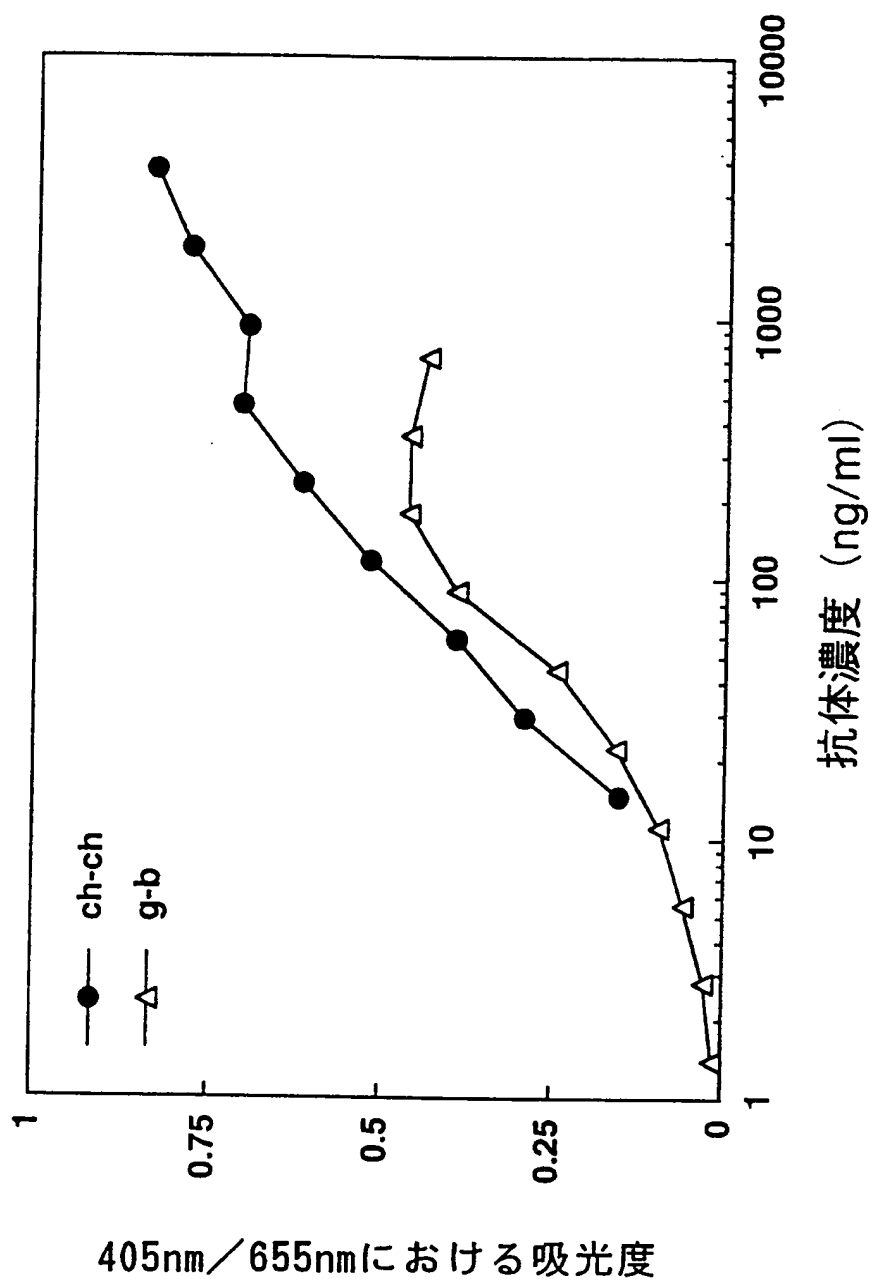


Fig.17



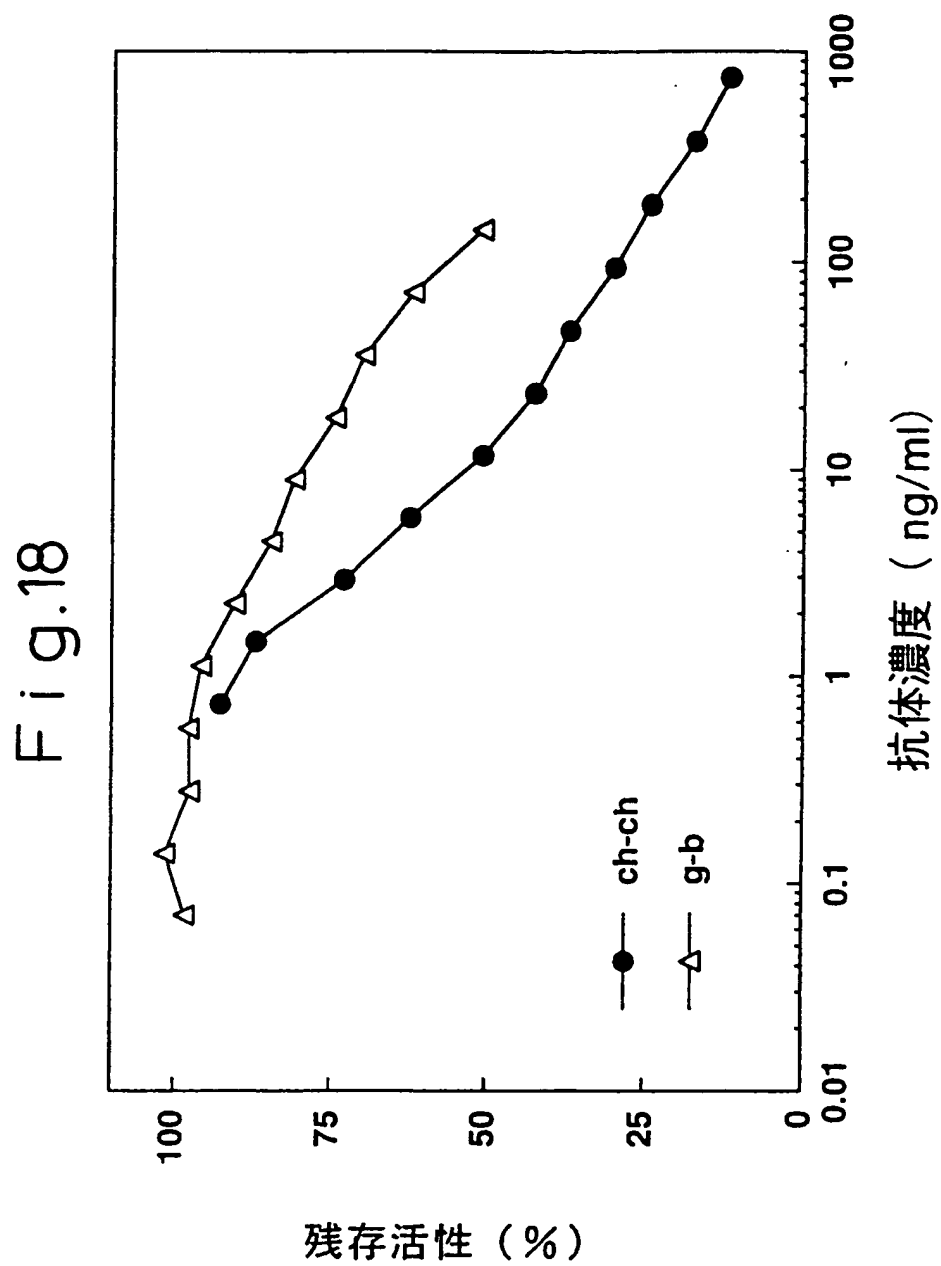


Fig. 19

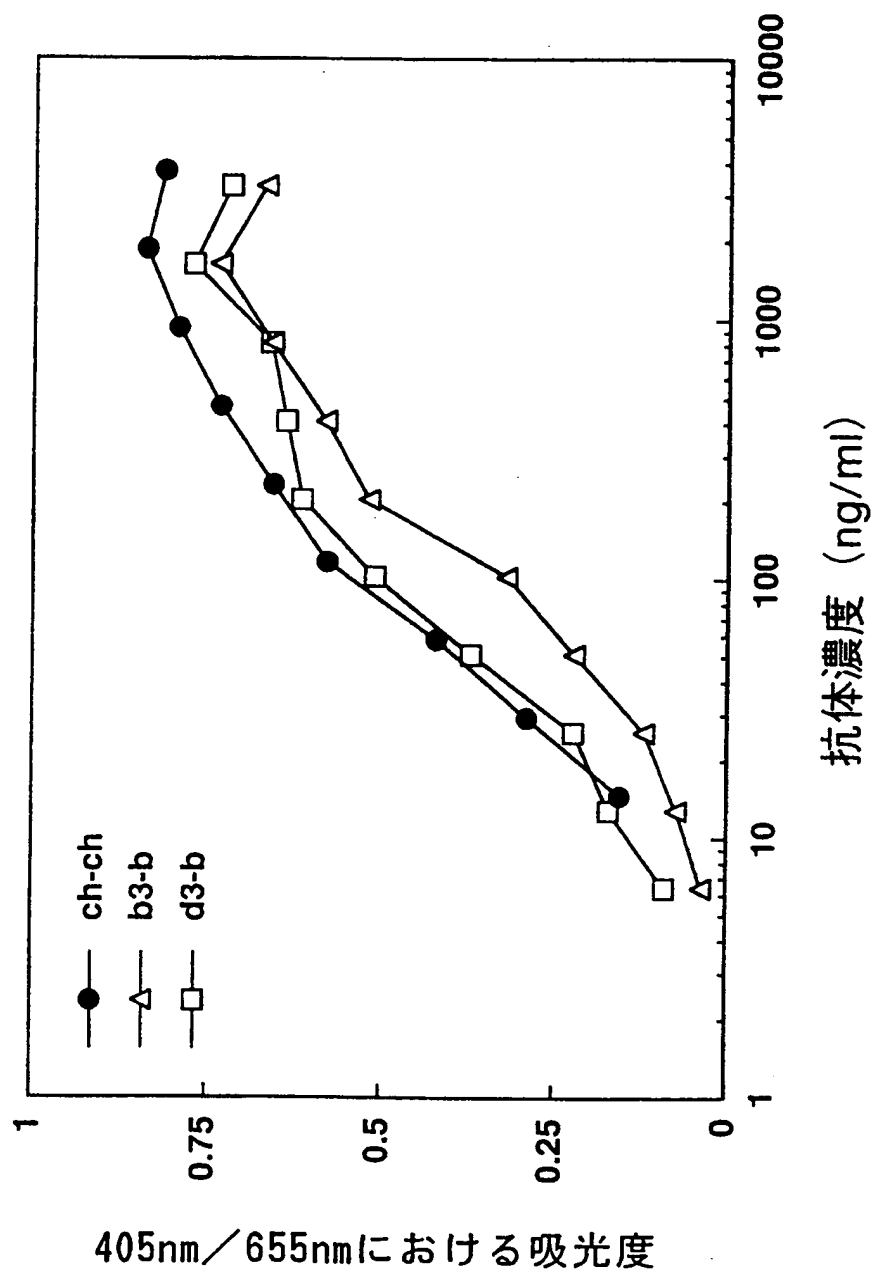


Fig. 20

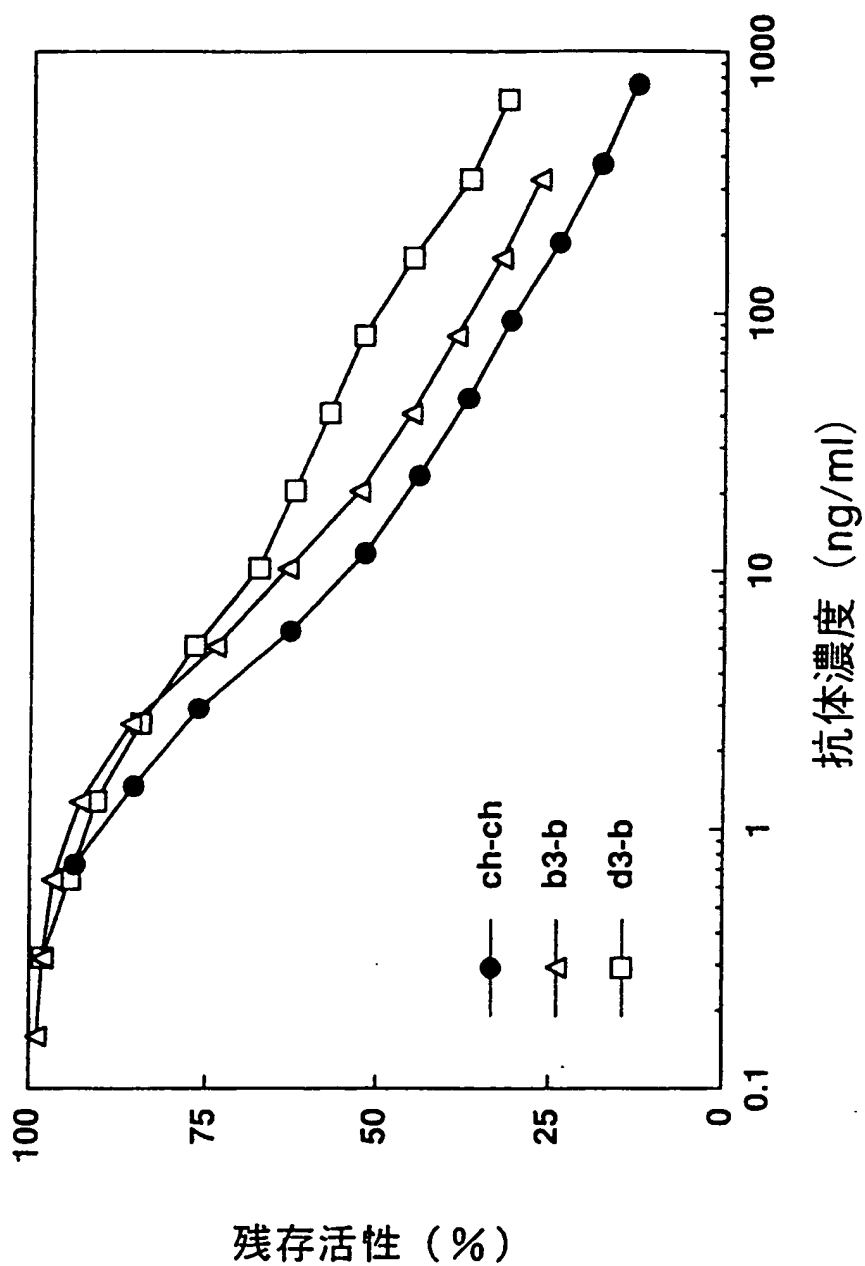
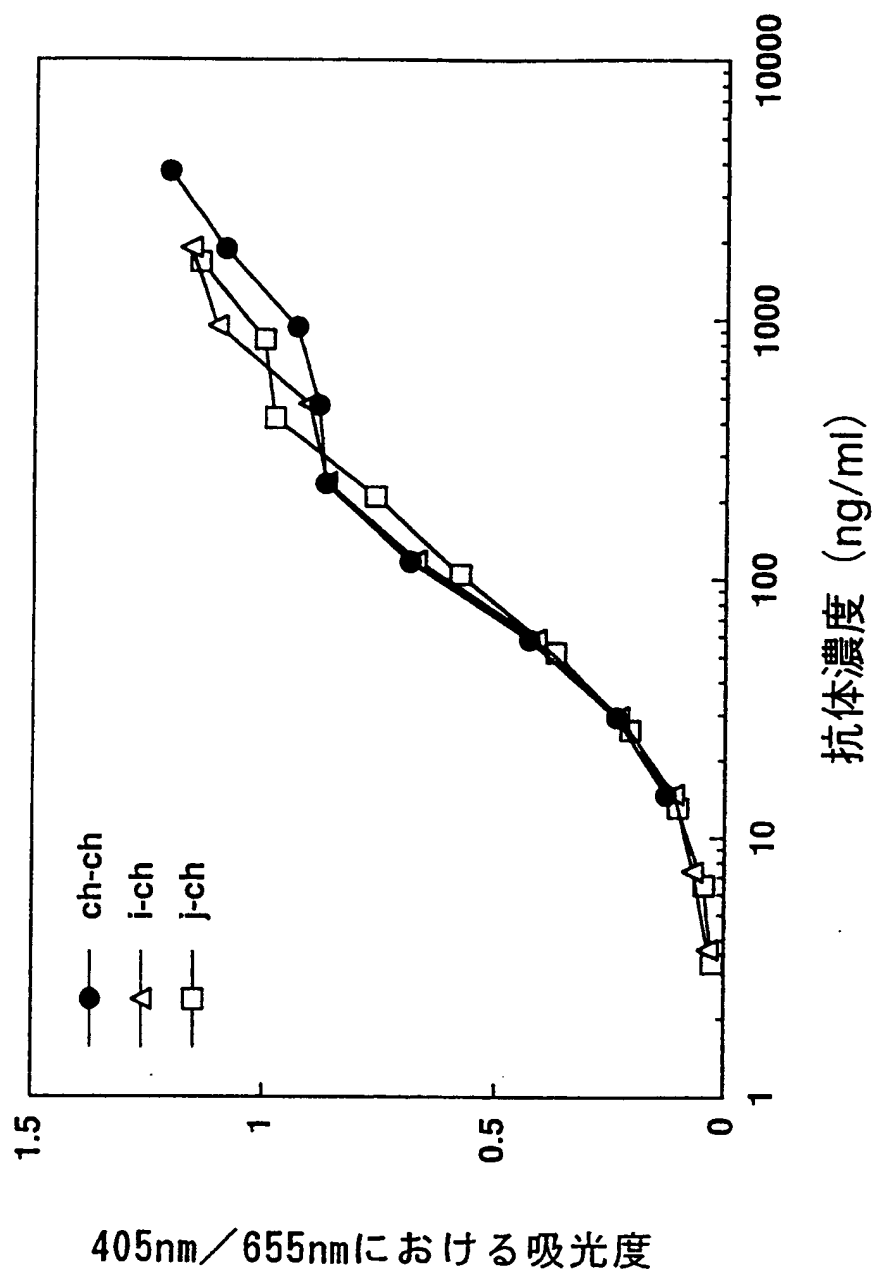


Fig.21





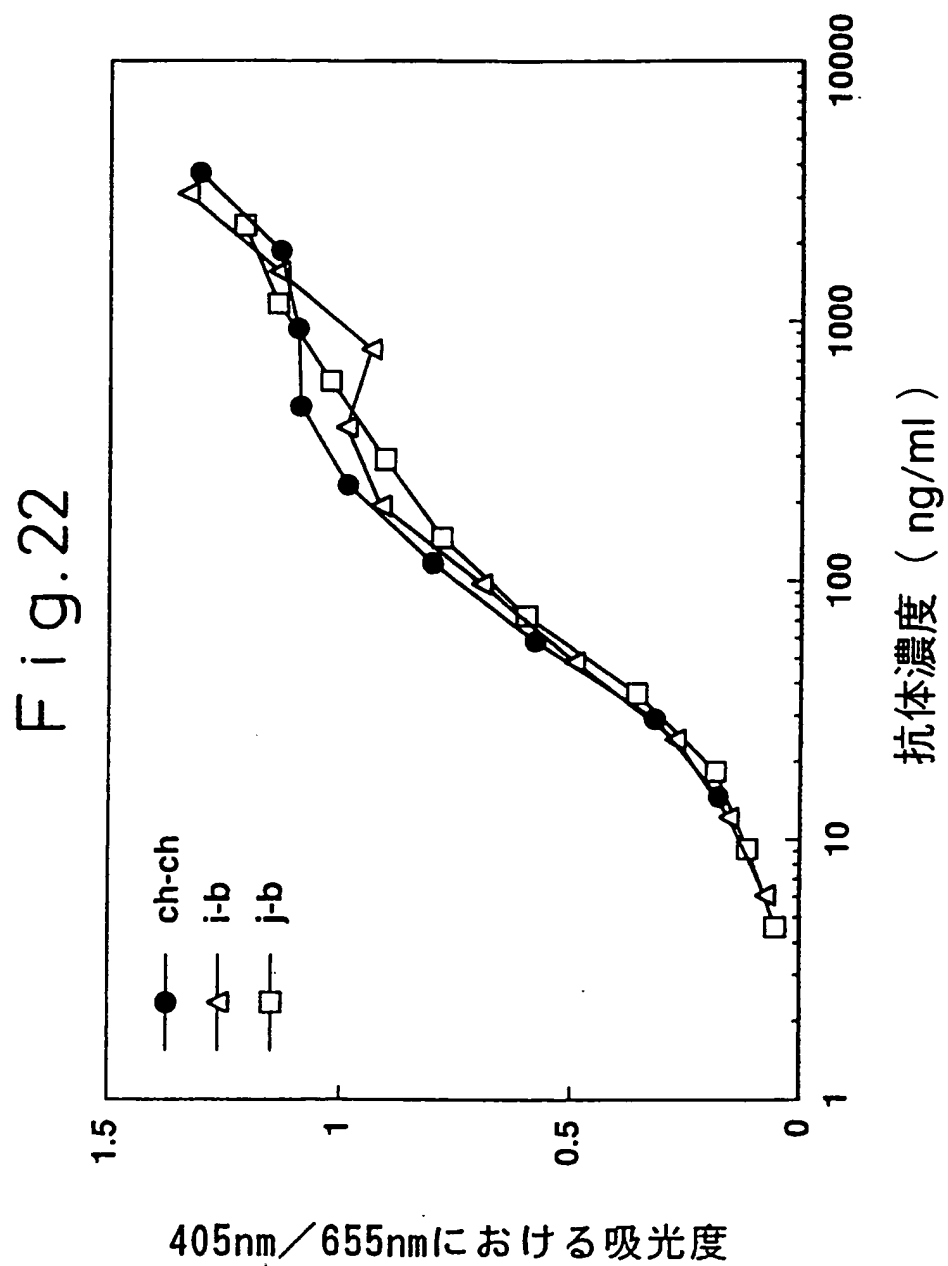


Fig.23

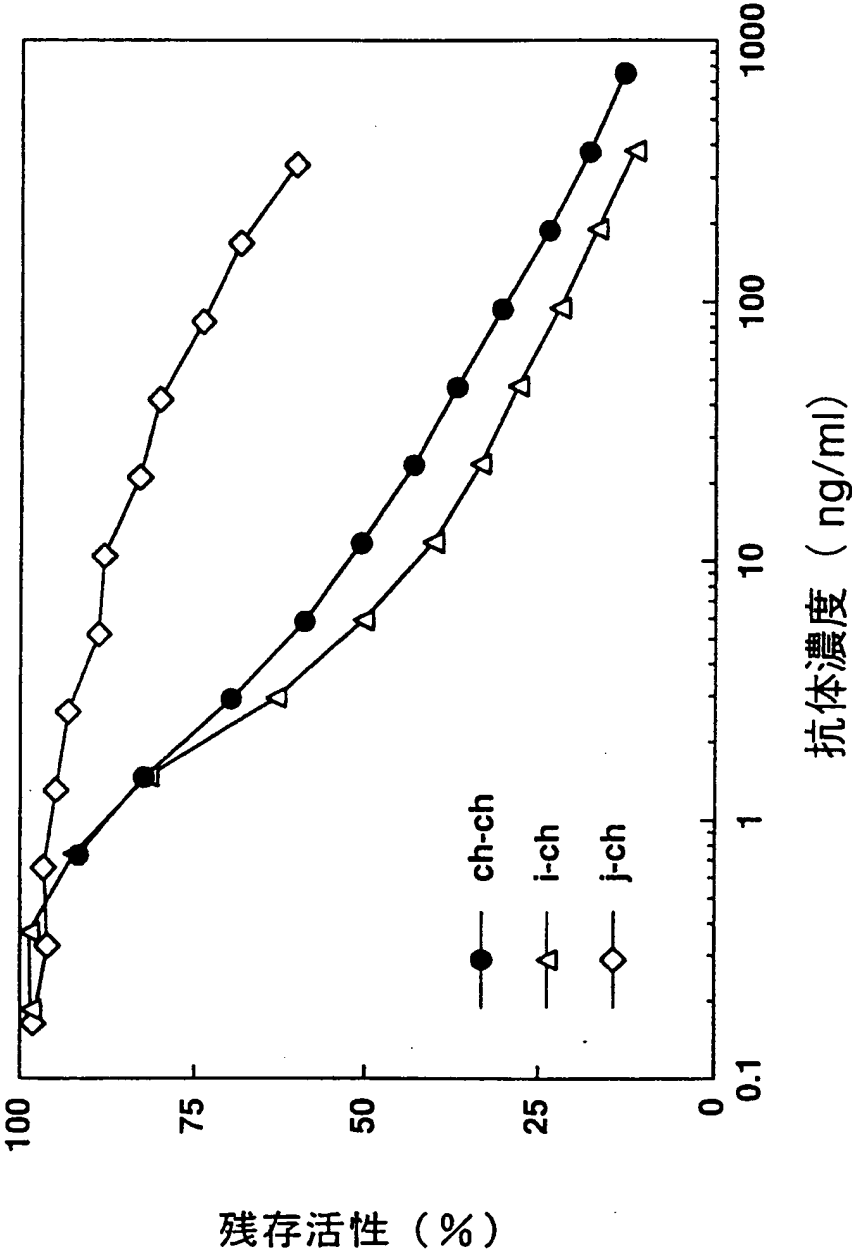


Fig.24

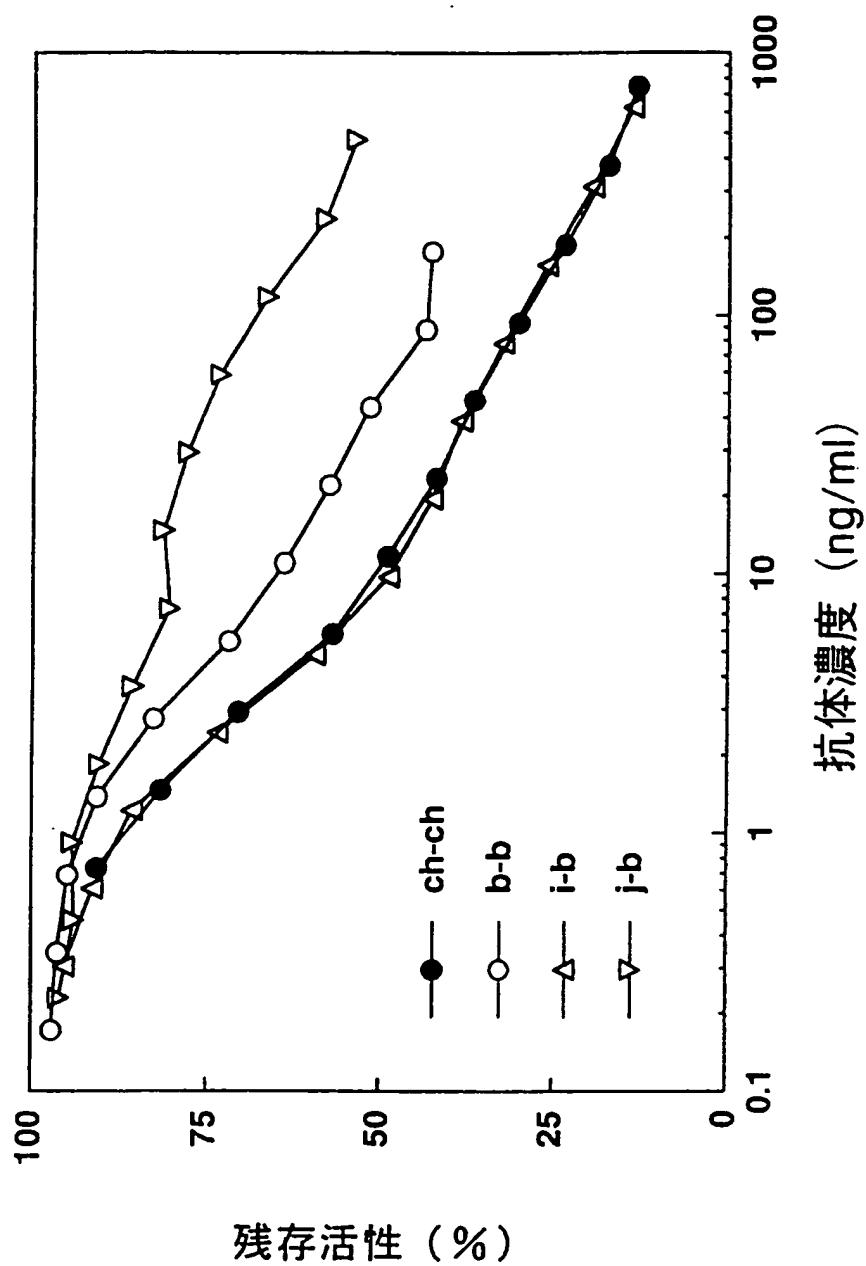
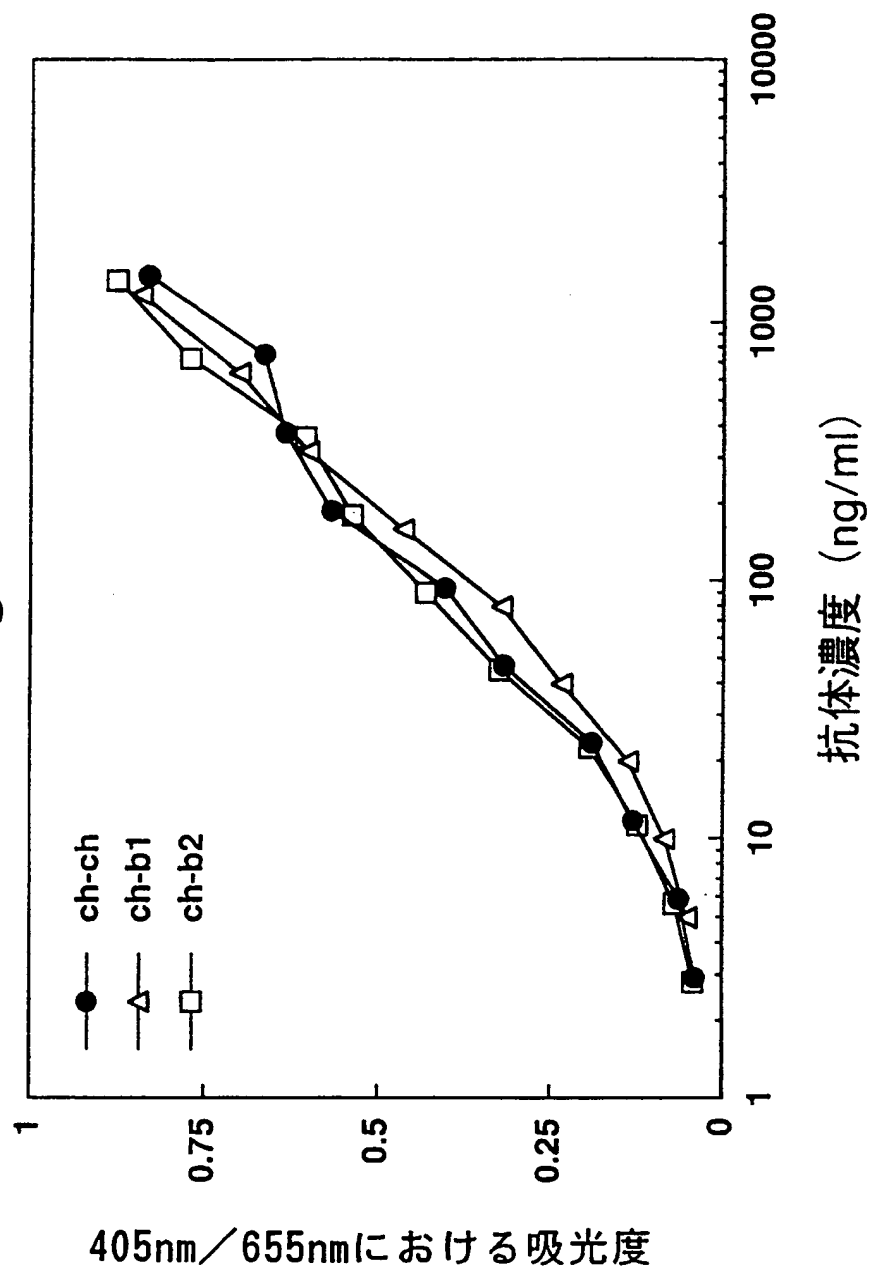
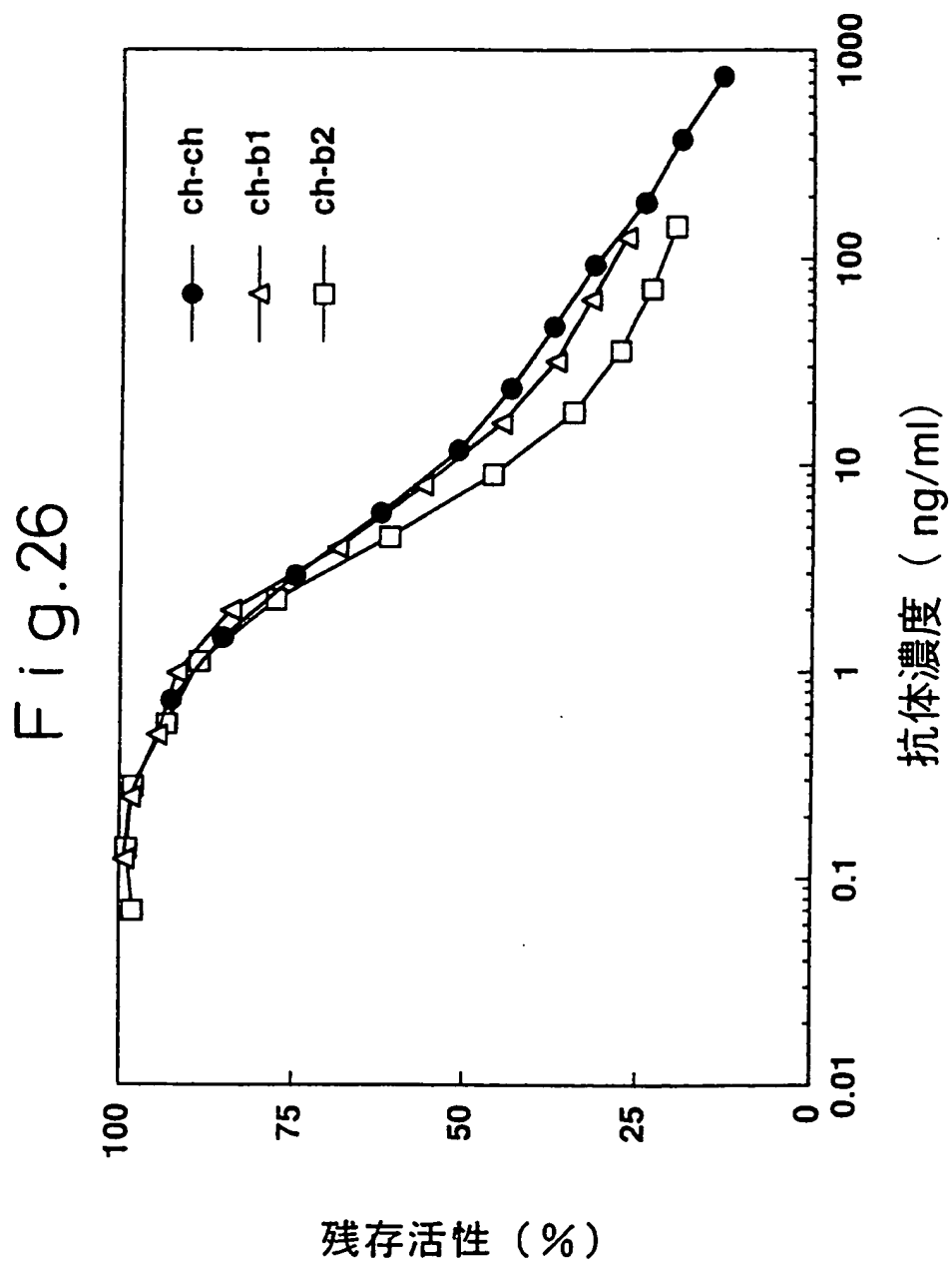


Fig.25





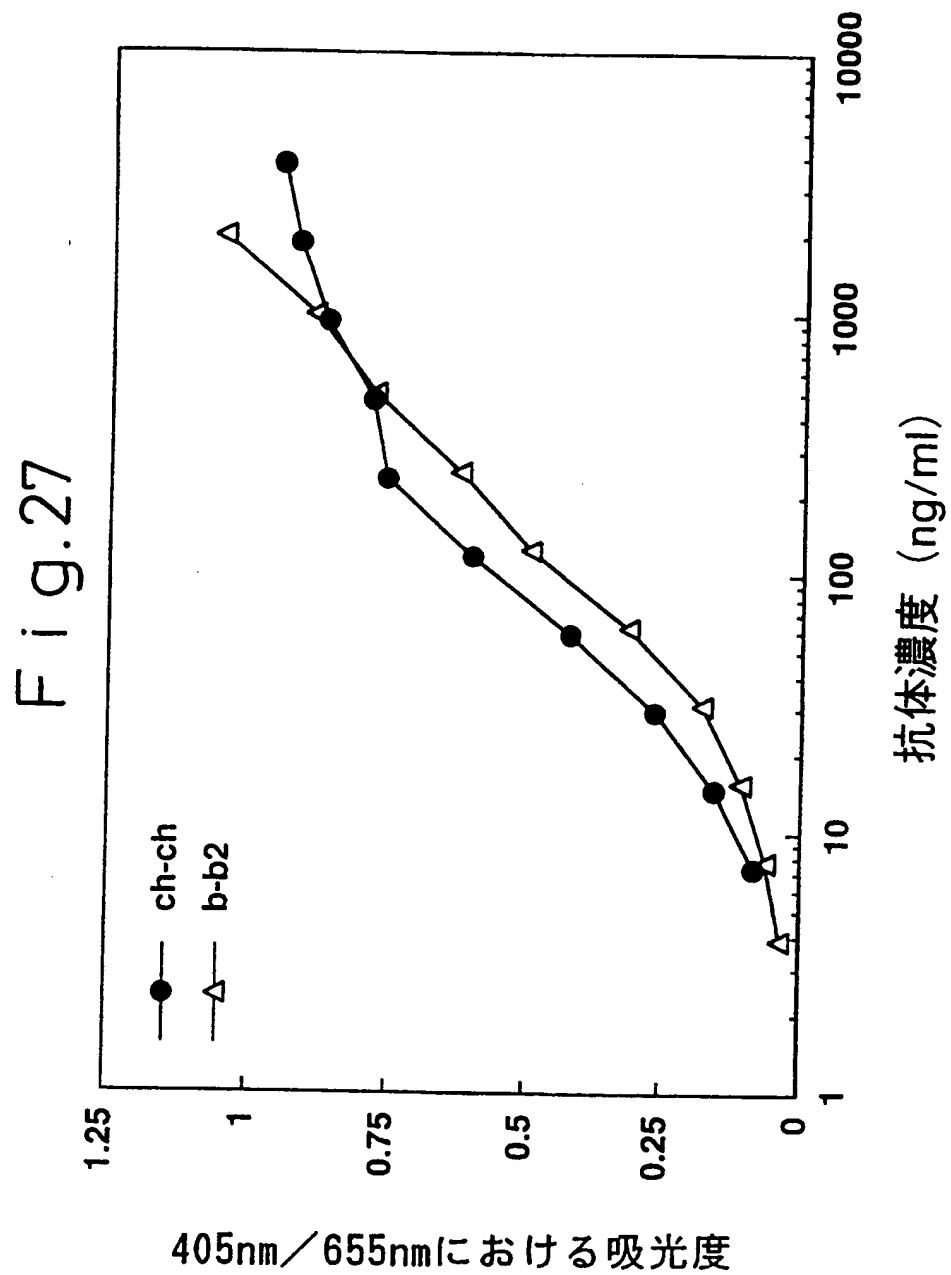


Fig.28

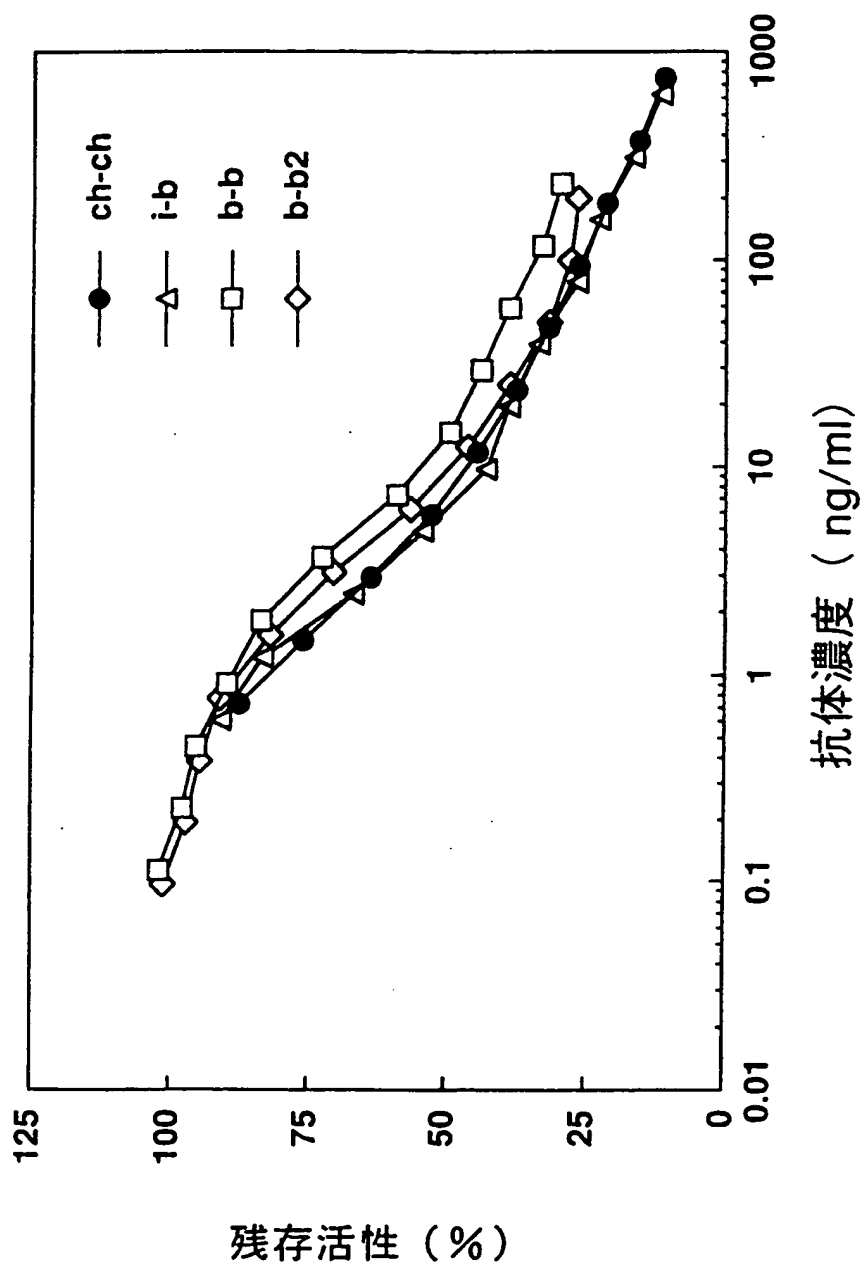
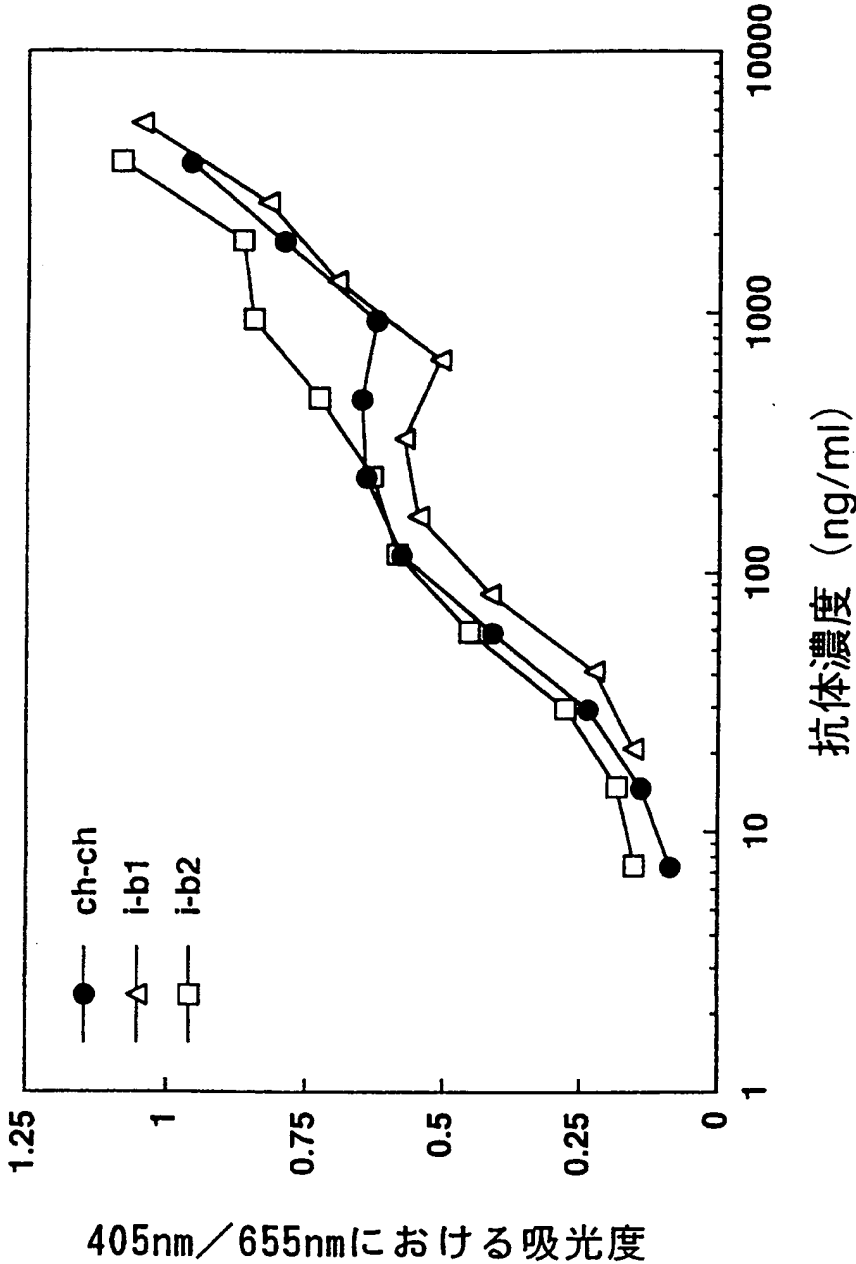


Fig. 29





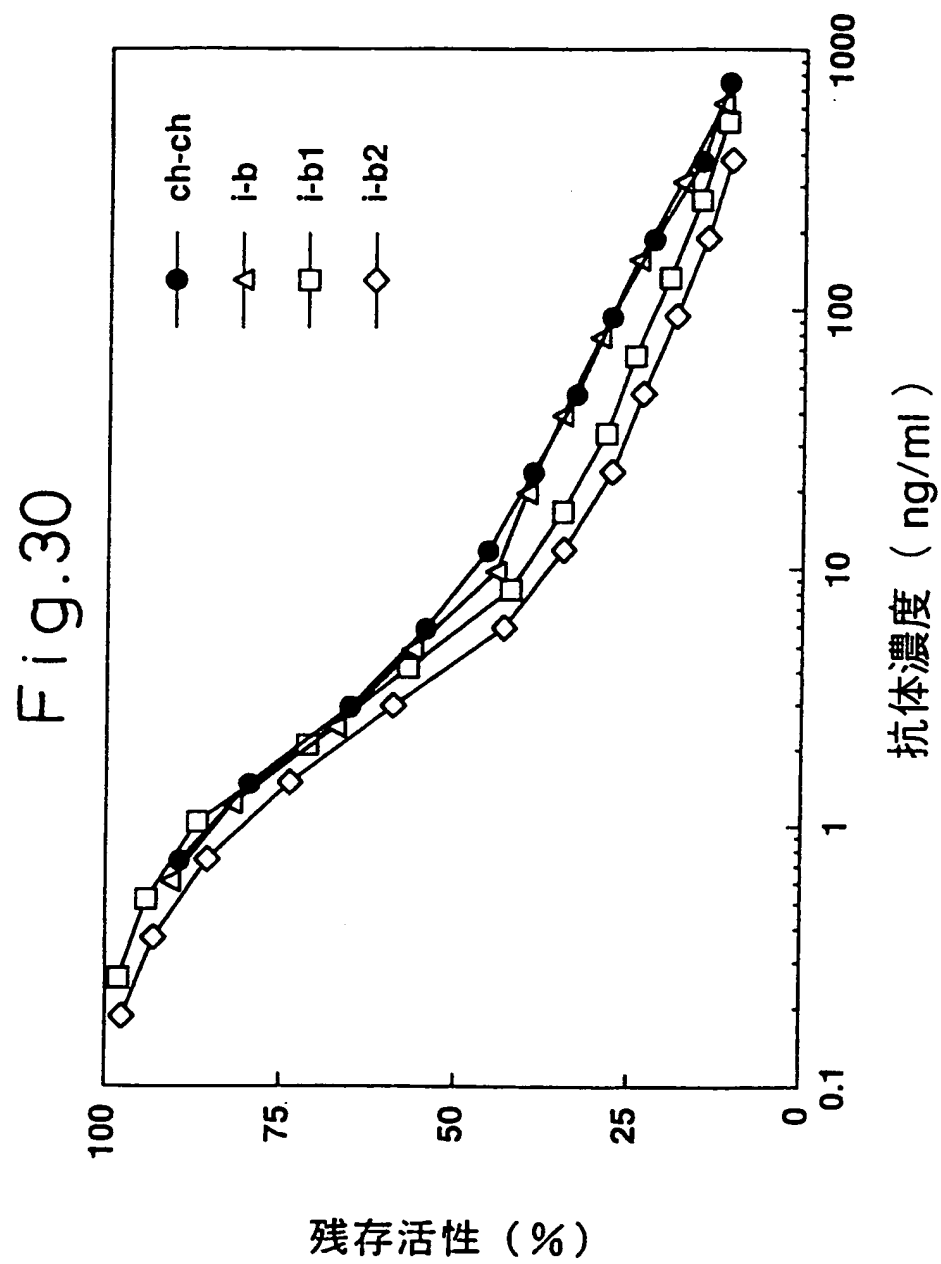


Fig.31

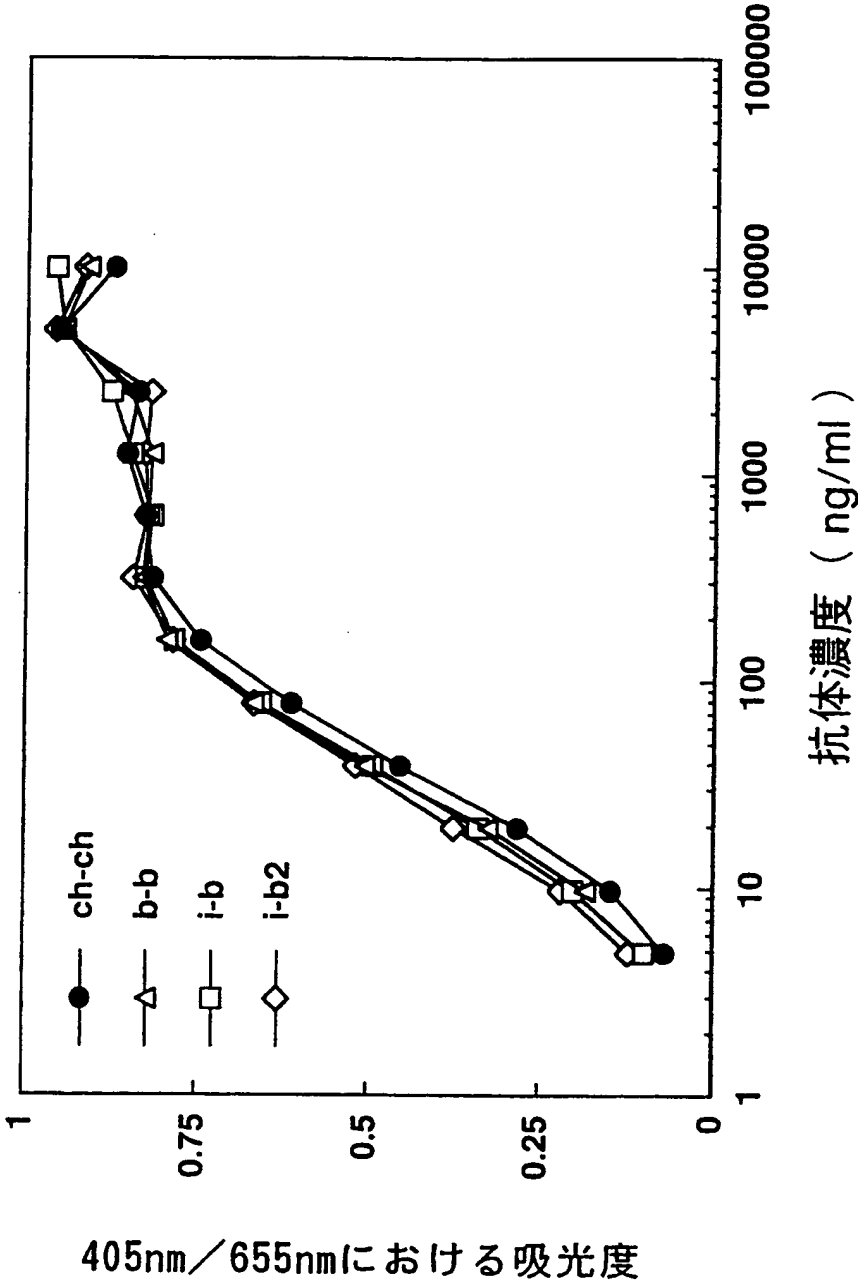


Fig.32

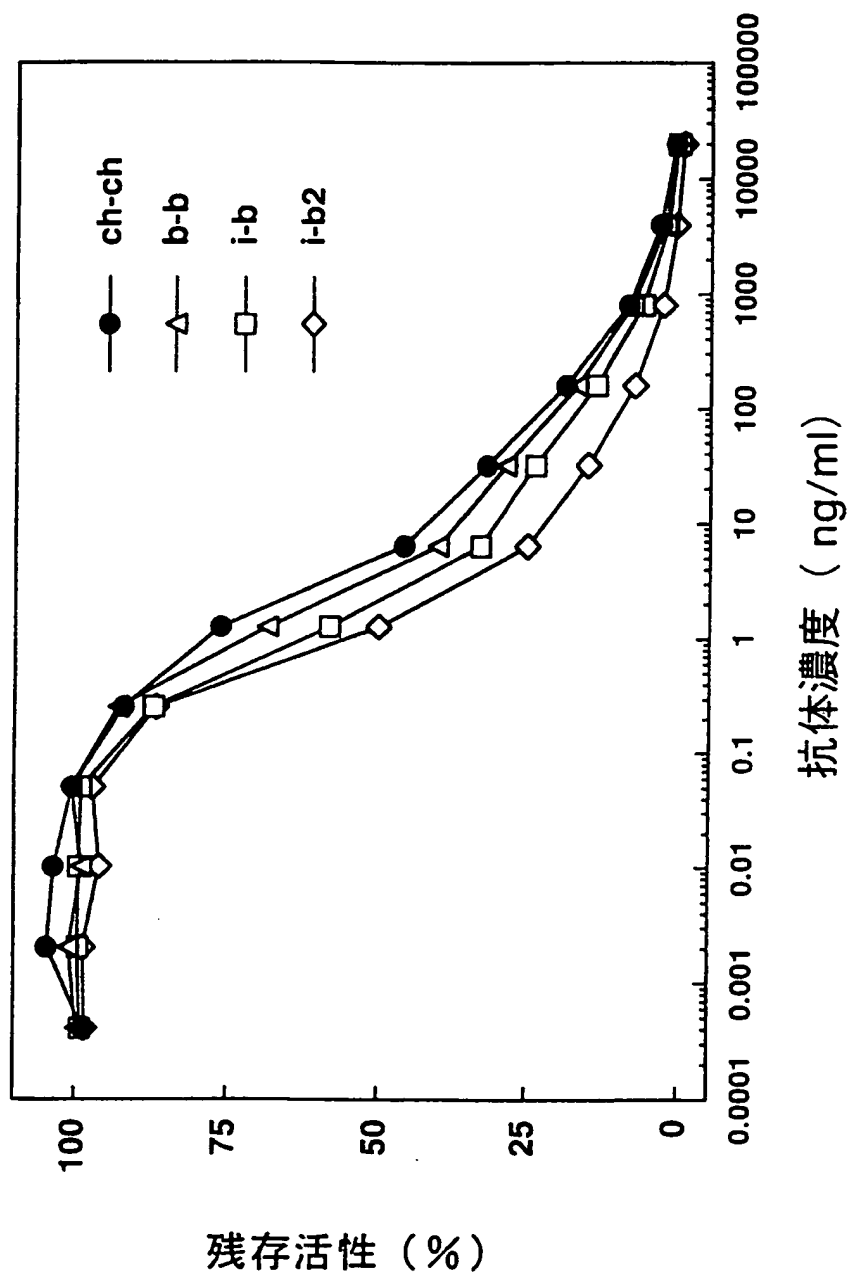


Fig.33

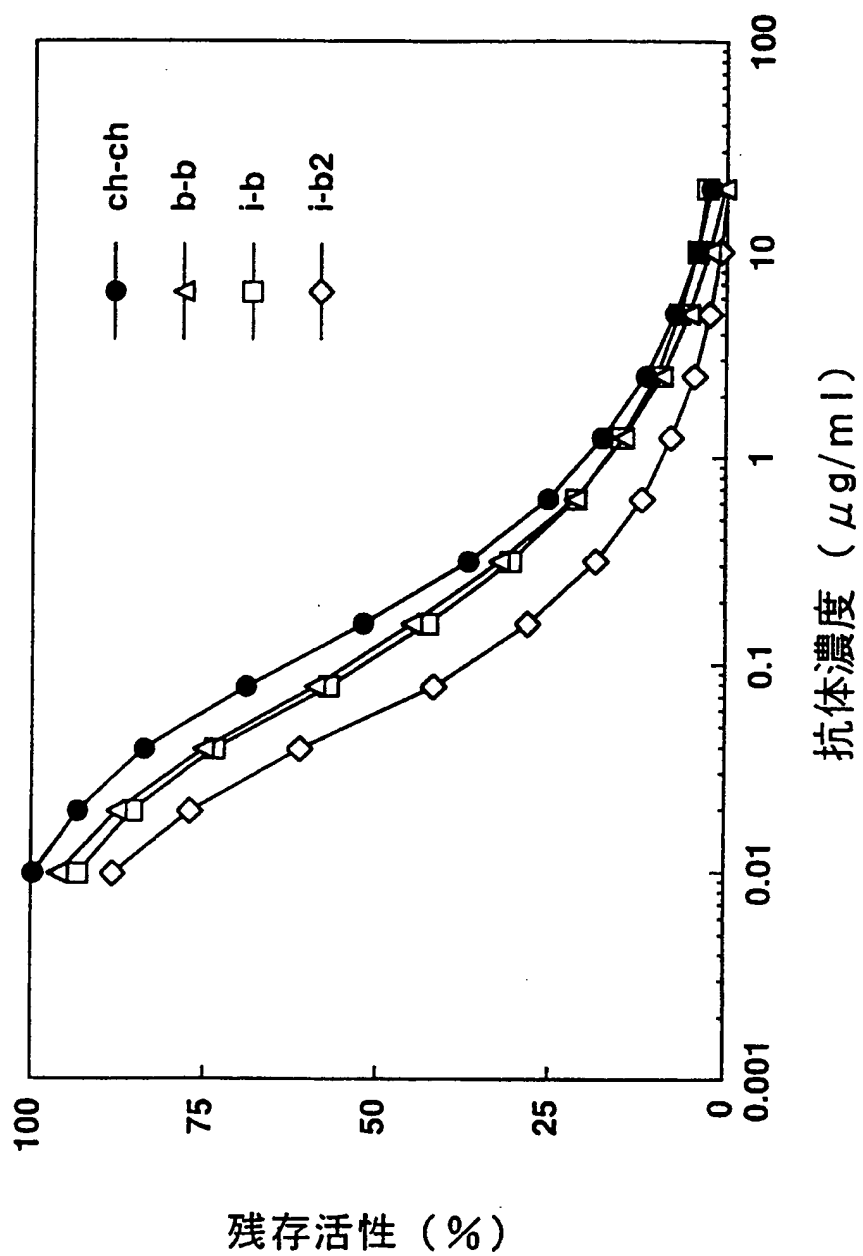


Fig.34

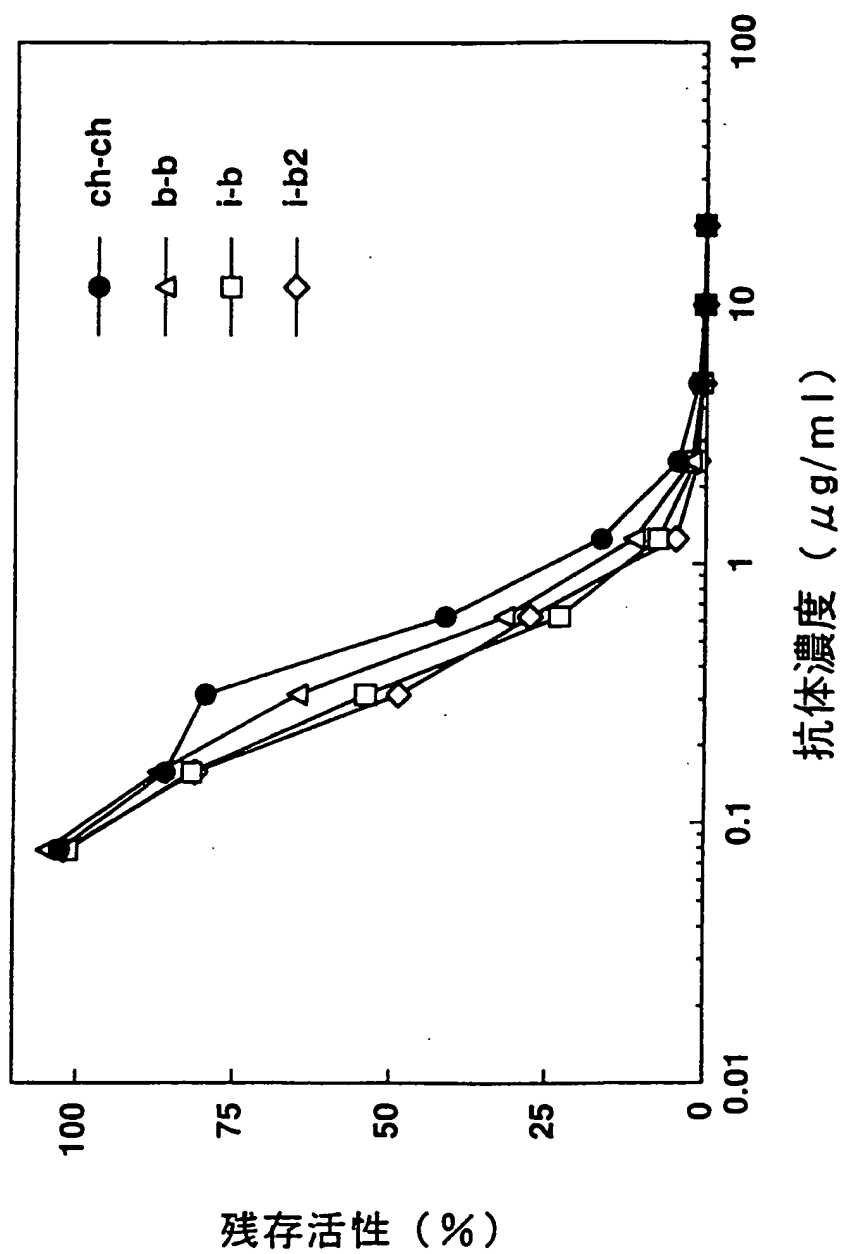
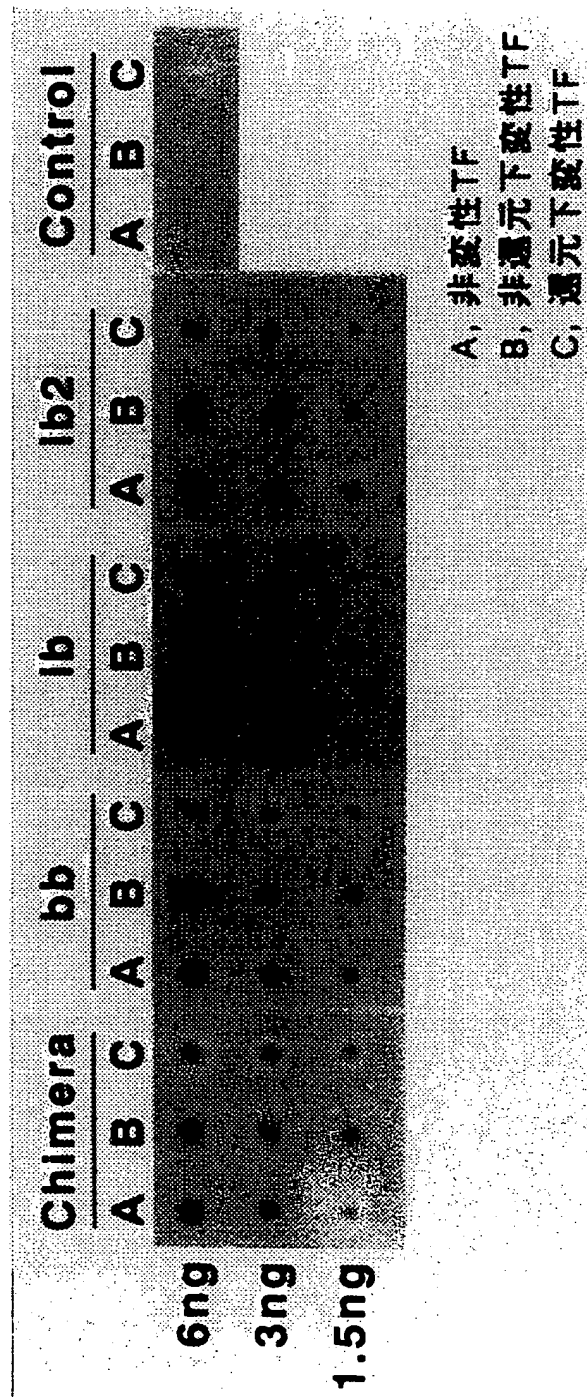


Fig. 35



## SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Humanized antibodies against human tissue factor (TF)  
and process for production of the humanited antibodies

<130> G821

<150> JP 10-91850

<151> 1998-04-03

<160> 152

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G1

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G2a

<400> 2

ggatcccggg agtggataga ccgatgg

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 3

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer M4

<400> 4

gttttcccag tcacgac

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer RV

<400> 5

caggaaacag ctatgac

17

<210> 6

<211> 411

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide



&lt;222&gt; (1)... (57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)... (441)

&lt;223&gt; Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-2

&lt;400&gt; 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15

-10

-5

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

1

5

10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

15

20

25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192

Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn

50

55

60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336  
 Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

95

100

105

caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 411  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

110

115

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(441)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-  
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-3

&lt;400&gt; 7

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48  
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15

-10

-5

```

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

          1              5              10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

          15              20              25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

          30              35              40              45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn

          50              55              60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

          65              70              75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

          80              85              90

tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

          95              100              105

caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca                                  411
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

          110              115

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 408

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)... (57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)... (408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-4

&lt;400&gt; 8

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg 96

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

1

5

10

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att 144

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp

50

55

60

ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
                   65                  70                  75  
 aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc 336  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val  
                   80                  85                  90  
 tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384  
 Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                   95                  100                 105  
 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                   110                 115

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 408

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-  
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

&lt;400&gt; 9

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg	
1 5 10	
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)... (57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)... (411)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-7

&lt;400&gt; 10

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	

gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac 240  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn

50

55

60

cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288  
 Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc 336  
 Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly

95

100

105

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(411)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-  
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8



&lt;400&gt; 11

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
act gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Thr Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly	
95 100 105	

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

<210> 12

<211> 375

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(54)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (55)...(375)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 12

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly

-15

-10

-5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96

Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser

1

5

10

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144

Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly

15

20

25

30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192  
 Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val

35

40

45

ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240  
 Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

50

55

60

agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu

65

70

75

cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336  
 Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr

80

85

90

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375  
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(54)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (55)...(375)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-3

&lt;400&gt; 13

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt 48

Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly

-15

-10

-5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct 96

Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser

1

5

10

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt 144

Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly

15

20

25

30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc 192

Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val

35

40

45

ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc 240

Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

50

55

60

agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta 288

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu

65

70

75

cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336

Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr

80

85

90

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(66)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (67)...(387)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-  
i-TF mouse monoclonal antibody ATR-4

&lt;400&gt; 14

atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp

-20

-15

-10

ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc 96

Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5

1

5

10

atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt 144

Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser

15

20

25

cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa 192

Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln

30

35

40

tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc 240

Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val

45

50

55

```

cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc 288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr
      60              65              70
atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag 336
Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
      75              80              85              90
cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata 384
His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
              95              100              105
aaa 387

```

Lys

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 381

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(60)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

&lt;400&gt; 15

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20              -15              -10              -5

```

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96  
 Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr  
                   1                  5                  10  
 gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144  
 Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
                   15                  20                  25  
 att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct 192  
 Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro  
                   30                  35                  40  
 aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240  
 Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
                   45                  50                  55                  60  
 aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn  
                   65                  70                  75  
 aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt 336  
 Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly  
                   80                  85                  90  
 gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381  
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   95                  100                  105

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(394)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-7

<400> 16

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa 48

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu

-15 -10 -5

atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tct gtt 96

Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val

1 5 10

acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc 144

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

15 20 25

tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca 192

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro

30 35 40 45

ggc cag tct cca aag cgc ctg atc tat ctt gtg tct aaa ctg gac tct 240

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

50 55 60

gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

65 70 75



ctg aaa atc agc aga glg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

80

85

90

tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 336  
 Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

95

100

105

gaa ata aaa 393

Glu Ile Lys

110

<210> 17

<211> 393

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)... (393)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-  
 i-TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat 48  
 Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp

-15

-10

-5

```

atc aac ggt gat gtt gta ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt      96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val

          1              5              10

acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc      144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

          15              20              25

tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca      192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro

          30              35              40              45

ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct      240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

          50              55              60

gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca      288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

          65              70              75

ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt      336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

          80              85              90

tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg      384
Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

          95              100              105

gaa ata aaa                                                                393
Glu Ile Lys

```

110

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HS

<400> 18

gtctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcac

35

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 19

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga

28

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LS

<400> 20

gtctagatct ccacatgag ggcccctgct cagtt

35

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 21

tggtcgtacg ttttatttcc agcttggg 28

<210> 22

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv1S

<400> 22

ttctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcattcttct tcctgatggc agtgggtaca 60

ggggttaact cacaggtgca gctgttggag tctggagctg tgct 104

<210> 23

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv28

<400> 23

acaggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60

ctcctgcaag gcttcggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

<210> 24

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 24

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60  
atccgccagt attgcctact tggagttctc gagcctgaca aatgagga 108

<210> 25

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv3A

<400> 25

tcatacatatc tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60  
ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv5A

<400> 26

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60  
ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc 110

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrS

<400> 27

ttctgtcgac ccaccatga

19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 28

agaagctagc tgaggagac

19

<210> 29

<211> 415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized H chain V region

<400> 29

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg

48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser

65

70

75

att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc 336  
 Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 415  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chain V region

<400> 30

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS



<400> 31

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatc actgcagaca 60  
catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagctcgag 100

<210> 32

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBS

<400> 32

ggagctctcg agctcgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60  
ctatgccatg gttct 75

<210> 33

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFA

<400> 33

ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60  
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 34

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBA

&lt;400&gt; 34

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3NMFS

&lt;400&gt; 35

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60

catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3NMBS

&lt;400&gt; 36

gaggctctcg agtgtgacag ccgcggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct 75

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3NMFA

<400> 37

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60  
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 38

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBA

<400> 38

agaaccatgg catagcccgga gtctcttgca cagtaataata cggctgtgtc cgcggctgtc 60  
acactcgaga gcctc 75

<210> 39

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanize  
d H chain V region

<400> 39

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

          -15                -10                -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

          1                5                10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

          15                20                25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

          30                35                40                45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

          50                55                60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

          65                70                75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

          80                85                90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

          95                100                105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110                                115

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of version "b" of humanized H chain V region

&lt;400&gt; 40

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized H chain V region

<400> 41

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn

65

70

75

cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336  
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chain  
 n V region

&lt;400&gt; 42

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65

70

75

80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3EPS

&lt;400&gt; 43

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60

aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3EPA

&lt;400&gt; 44

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc 60



agaclcgaga gclcc 75

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 45

ttcttggcca tagtatgtat 20

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 46

agaaccatgg catagccc 18

<210> 47

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHS

<400> 47

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg 60

agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag 100

<210> 48

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3vHA

<400> 48

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60

agactgttga gctcc 75

<210> 49

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanize  
d H chain V region

<400> 49

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

```

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att   144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

      15              20              25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta   192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

      30              35              40              45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac   240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

              50              55              60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc   288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

              65              70              75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta   336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

              80              85              90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa   384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

              95              100              105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc   414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

      110              115

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Amino acid sequence of version "d" of humanized H chai

```

n

&lt;400&gt; 50

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanized H chain V region

<400> 51

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys

65

70

75

ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt 336

Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chain V region

<400> 52

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 53

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSS

<400> 53

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

<210> 54

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSA

<400> 54

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60

aggctcctga gctcc 75

<210> 55

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDS

<400> 55

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60

aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

<210> 56

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDA

<400> 56

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60

aggctcgaga gttgc 75

<210> 57

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "f" of humanized H chain V region

<400> 57



atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
                     1                    5                    10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
                     15                    20                    25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
                     30                    35                    40                    45  
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
                     50                    55                    60  
 ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser  
                     65                    70                    75  
 aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
                     80                    85                    90  
 tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     95                    100                    105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
                     110                    115

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chain V region

&lt;400&gt; 58

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanized H chain V region

<400> 59

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser  
                   65                  70                  75  
 aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                   80                  85                  90  
 tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                   95                  100                 105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
                  110                 115

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chain V region

<400> 60

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr  
           1                  5                  10                  15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr  
                   20                  25                  30  
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                  40                  45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3ADS

&lt;400&gt; 61

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60

agtctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3ADA

&lt;400&gt; 62

agaacatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgc cgaggcctta 60

aggctggtcc actgt

75

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "h" of humanized H chain

&lt;400&gt; 63

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc 288  
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser

65

70

75

gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata 336  
Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chain  
n V region

&lt;400&gt; 64

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3MMS

&lt;400&gt; 65

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR Shuffling primer F3MMA



<400> 66

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60

aggctgctca gtcc 75

<210> 67

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMS

<400> 67

ttcttgccca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca 60

catccgcgaa cacagcctac atggagtga ggagcctcag 100

<210> 68

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMA

<400> 68

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60

aggctcctca actcc 75

<210> 69

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanized H chain V region

<400> 69

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

65 70 75

aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg 336  
 Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110 115

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "i" of humanized H chain V region

<400> 70

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)... (57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanize  
d H chain V region

&lt;400&gt; 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanize  
d H chain V region

&lt;400&gt; 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192  
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac 288  
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of version "j" of humanized H chain

n V region

<400> 72

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 73

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPS

<400> 73

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaaatga 60

tcctgcgaat ggccattct 79

<210> 74

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

<400> 74

```
agaatggcca ttgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg   60
gcgcacccaa tgcatagaa                                           79
```

<210> 75

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized H chain V region

<400> 75

```
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg   48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
```

-15

-10

-5



```

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg   96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

      1             5             10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att   144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

      15             20             25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg   192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

      30             35             40             45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac   240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

              50              55              60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac   288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

              65              70              75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att   336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

              80              85              90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa   384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

              95             100             105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                               414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

      110             115

```

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized H chain in V region

<400> 76

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 77

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "dl" of humanized H chain V region

<400> 77

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15 -10 -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1 5 10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H cha  
 in V region

&lt;400&gt; 78

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 79

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHS

<400> 79

ttctatgcat tgggtgcgac aggcccttg acaagggcctt gagggaatga 60

tcctgcgaat ggccatctt 79

<210> 80

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHA

<400> 80

aagatggcca ttgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgct caggggcctg 60

tcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 81

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b3" of humanized H chain V region

<400> 81

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtc cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288  
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H chain  
in V region

&lt;400&gt; 82

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig-peptide

&lt;222&gt; (1)...(57)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat-peptide

&lt;222&gt; (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humanized H chain V region

&lt;400&gt; 83

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5



gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96  
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
 1 5 10  
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144  
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 15 20 25  
 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240  
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
 50 55 60  
 ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288  
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
 65 70 75  
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90  
 tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105  
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d3" of humanized H chain in V region

<400> 84

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Thr
1				5						10				15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
				20					25				30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35				40				45			
Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Ser	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe
				50				55				60			
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
				65				70				75		80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
						85				90			95		
Ala	Arg	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100				105				110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser									

<210> 85

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector LvlS

&lt;400&gt; 85

gtctagatct ccaccatgag ggccccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctgggtt 60  
ccagggaacc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR shuffling vector h5Lv4S

&lt;400&gt; 86

ttggcagatg gggccccatc aagggtcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc 60  
accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR shuffling vector h5Lv2A

&lt;400&gt; 87

cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtagactct gtctcctaca 60  
gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 88

gatgggaccc catctgcca actagtgtgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60

ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc 98

<210> 89

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv5A

<400> 89

tgttcgtacg ttgatctcc accttgggcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60

gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvS

<400> 90

gtctagatct ccaccatgag 20

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvA

<400> 91

tggtcgtacg ttgatctc

19

<210> 92

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized L chain V region

<400> 92

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

```

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
      45              50              55              60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
              65              70              75
agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
              80              85              90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      95              100              105

```

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized L chain V region

&lt;400&gt; 93

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1              5              10              15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
              20              25              30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
              35              40              45

```

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR shuffling primer F3SS

&lt;400&gt; 94

gtctggtacc gattacactc tcacatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FR shuffling primer F3SA

&lt;400&gt; 95

tggtctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggt accagac 77

&lt;210&gt; 96

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RS

<400> 96

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

<210> 97

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RA

<400> 97

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggt accagac 77

<210> 98

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)



<400> 98

7 4 / 1 0 9

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chain V region

<400> 99

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 100

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanized L chain V region

<400> 100

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381  
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chain V region

&lt;400&gt; 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 102

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SS

<400> 102

gtctcttaag ttggttcag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg 60

caactagtaa ca 72

<210> 103

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SA

<400> 103

tggtactagt tgcatagtag atcagggctc taggagattt ccctgggttc tgctggaacc 60

aacttaagag ac 72

<210> 104

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XS

<400> 104

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtcctg atctattatg 60  
 caactagtaa ca 72

<210> 105

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XA

<400> 105

tggtactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctcgtgttc tgctgatacc 60  
 aacttaagag ac 72

<210> 106

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humaniz  
 ed L chain V region

<400> 106

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48  
 Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20

-15

-10

-5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96  
 Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct 192  
 Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240  
 Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381  
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized L cha

in V region

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 108

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humaniz



<400> 108

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b2" of humanized L chain V region

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanize

d H chain V region

<400> 110

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20

25

30

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "a" to "j" of humanized H chain V region

<400> 111

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

5

10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b1" and "d1" of humanized H chain V region

<400> 112

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

5

10

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "b3" and "d3" of humanized H chain V region

<400> 113

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

5

10

<210> 114

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized H chain V region

<400> 114

Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu

5

10

15

Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions (b), (b1) and (

b3) of humanized H chain V region

<400> 115

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized  
H chain V region

<400> 116

Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions "d", "d1" and "  
d3" of humanized H chain V region

<400> 117

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "e" of humanized  
H chain V region

<400> 118

Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 119

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "f" of humanized  
H chain V region

<400> 119

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "g" of humanized  
H chain V region

<400> 120

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "h" of humanized  
H chain V region

<400> 121

Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln

5

10

15

Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "i" of humanized  
H chain V region

<400> 122

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "j" of humanized  
H chain V region

<400> 123

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanized H chain V region

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

5

10

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR1 of all versions of humanized L chain V region

<400> 125

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of versions "a", "b" and "c" of humanized L chain V region

<400> 126

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of version "b1" of humanized L chain V region

<400> 127

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR2 of version "b2" of humanized L chain V region

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "a" of humanized  
L chain V region

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of versions "b", "b1" and "  
b2" of humanized L chain V region

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 131

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of FR3 of version "c" of humanized  
L chain V region

<400> 131

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of FR4 of all versions of humanize  
d L chain V region

&lt;400&gt; 132

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

5

10

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humaniz  
ed H chain V region

&lt;400&gt; 133

Asp Tyr Tyr Met His

5

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humanized H chain V region

<400> 134

Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humanized H chain V region

<400> 135

Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

5

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR1 of all versions of humanized L chain V region

<400> 136

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser

5

10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR2 of all versions of humanized L chain V region

<400> 137

Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of CDR3 of all versions of humanized L chain V region

<400> 138

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

5

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 139

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-3

<400> 140

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-4

&lt;400&gt; 141

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15



Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

&lt;400&gt; 142

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-7

&lt;400&gt; 143

Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr

20

25

30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-8

&lt;400&gt; 144

Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65                                      70                                      75                                      80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85                                      90                                      95

Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100                                      105                                      110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 145

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-2

<400> 145

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

5                                      10                                      15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20                                      25                                      30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile

35                                      40                                      45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                                      55                                      60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65                                      70                                      75                                      80

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-3

&lt;400&gt; 146

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65

70

75

80

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

&lt;210&gt; 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-4

<400> 147

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse

se monoclonal antibody ATR-5

<400> 148

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser

65

70

75

80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-7

<400> 149

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp  
 85 90 95

Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-8

<400> 150

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45



Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

85

90

95

Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 151

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for soluble human TF

<400> 151

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa 240  
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys  
 35 40 45  
 tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg 288  
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val  
 50 55 60  
 aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca 366  
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala  
 65 70 75 80  
 ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac 384  
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn  
 85 90 95  
 tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca 432  
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr  
 100 105 110  
 att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa 480  
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu  
 115 120 125  
 gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg 528  
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct 576  
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser  
 145 150 155 160  
 tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg 624  
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu  
 165 170 175

att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg 672

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180

185

190

att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat 768

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp

210

215

220

gac gat aaa taa

780

Asp Asp Lys

225

<210> 152

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 152

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys  
 35 40 45  
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val  
 50 55 60  
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn  
 85 90 95  
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr  
 100 105 110  
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu  
 115 120 125  
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu  
 165 170 175  
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val  
 180 185 190  
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu  
 195 200 205  
 Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp  
 210 215 220  
 Asp Asp Lys  
 225

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01768

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GENESEQ, PIR, Swiss-Prot		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/40921, A1 (JOHNSON & JOHNSON), 19 December, 1996 (19. 12. 96) & EP, 833911, A	1, 3, 33, 34, 49, 50, 53, 54, 65-68, 77-80
Y	JP, 1-503438, A (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION), 22 November, 1989 (22. 11. 89) & WO, 94/05328, A1 & US, 5110730, A & US, 5223427, A & EP, 309548, A & US, 5437864, A	1, 3, 33, 34, 49, 50, 53, 54, 65-68, 77-80
A	JP, 4-505398, A (CELLTECH LTD.), 24 September, 1992 (24. 09. 92) & WO, 91/09968, A1 & EP, 460167, A & EP, 460171, A & EP, 460178, A & EP, 620276, A & EP, 626390, A & WO, 91/09966, A1 & WO, 91/09967, A1 & JP, 4-506458, A & JP, 5-500312, A	1, 3, 33, 34, 49, 50, 53, 54, 65-68, 77-80
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 June, 1999 (24. 06. 99)		Date of mailing of the international search report 6 July, 1999 (06. 07. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01768

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical matter in common in the present invention resides in a humanized antibody against human tissue factor. As the results of searching, however, it is clarified that the humanized antibody against human tissue factor is not a novel one since the literature WO, 96/40921 A (JOHNSON & JOHNSON), 19. December 1996 discloses the same.

As a result, the humanized antibody against human tissue factor falls within the category of the prior art. Such being the case, this common matter (the humanized antibody against human tissue factor) cannot be regarded as a special technical matter in the meaning as defined in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT. Accordingly, there is no technical matter common to all claims. Since there is no other technical matter common thereto which is seemingly a special technical matter in the meaning as defined in the second sentence in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT, these inventions differing from each other do not have technical relevancy to each other as specified in Rule 13 of the Regulations under the PCT.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The international search report is established on a chimeric H chain wherein the H chain V region as set forth in claim 1 has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:139; a chimeric antibody having this H chain; a DNA encoding this H chain; an expression vector containing this DNA; a host transformed by this expression vector; and a process for producing the above chimeric antibody.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12N15/13, C12P21/08, C12N5/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GENESEQ, PIR, Swiss-Prot		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 96/40921, A1 (JOHNSON&JOHNSON) 19. 12月. 1996 (19. 12. 96) & EP, 833911, A	1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
Y	JP, 1-503438, A (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) 22. 11月. 1989 (22. 11. 89) & WO, 94/05328, A1 & US, 5110730, A & US, 5223427, A & EP, 309548, A & US, 5437864, A	1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
A	JP, 4-505398, A (CELLTECH LTD.) 24. 9月. 1992 (24. 09. 92) & WO, 91/09968, A1 & EP, 460167, A & EP, 460171, A & EP, 460178, A & EP, 620276, A & EP, 626390, A & WO, 91/09966, A1 & WO, 91/09967, A1 & JP, 4-506458, A & JP, 5-500312, A	1, 3, 33, 34, 4 9, 50, 53, 54, 6 5~68, 77~80
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	24. 06. 99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

本願発明において共通の事項は、 $\text{H}$ 組織因子に対する $\text{H}$ 型化抗体である。しかしながら、調査の結果、 $\text{H}$ 組織因子に対する $\text{H}$ 型化抗体は、文献W0, 96/40921, A (JOHNSON&JOHNSON), 19. 12月. 1996に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、 $\text{H}$ 組織因子ない対する $\text{H}$ 型化抗体は先行技術の域を出ないから、PCT規則13. 2の第2文の意味において、この共通事項( $\text{H}$ 組織因子に対する $\text{H}$ 型化抗体)は特別な技術的事項でない。

それ故、請求の範囲の全てに共通の事項はない。PCT規則13. 2の第2文において特別な技術的事項と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な連関を見いだすことはできない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1の $\text{H}$ 鎖V領域が配列番号:139の $\text{A}/\text{M}$ 酸配列を有する $\text{H}$ 鎖、及び該 $\text{H}$ 鎖を有する $\text{H}$ 抗体、該 $\text{H}$ 鎖をコードするDNA、該DNAを含む発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された宿主、該 $\text{H}$ 抗体の製造方法について国際調査報告を作成する。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。